



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**INTERACCIÓN DE LA METALOPROTEINASA DE
MATRIZ 9 CON CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÓNICA: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
FUNCIONAL**

DOCTORADO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

ESTEFANÍA UGARTE BERZAL

2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BILOGÍA CELULAR

**INTERACCIÓN DE LA METALOPROTEINASA DE
MATRIZ 9 CON CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÓNICA: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
FUNCIONAL**

Este trabajo ha sido realizado por Estefanía Ugarte Berzal para optar al grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CSIC), bajo la dirección de la Dra. M^a de los Ángeles García Pardo.

Fdo: Dra. M^a de los Ángeles García Pardo.

A MI GENTE

AGRADECIMIENTOS

Después de tanto tiempo, ya esta acabando esta etapa, etapa en la que he aprendido en el ámbito científico pero también en el personal. Me han acompañado las personas de siempre y muchas nuevas que he ido conocido. Tengo que dar las gracias a todos, porque todos me habéis ayudado en algún u otro momento y con todos me he reído y he aprendido cosas. Esta tesis es para todos vosotros para MI GENTE, vosotros sabéis quienes sois y lo importantes que sois para mí, sois maravillosos. A todos os podría escribir un montón de cosas, tengo miles de recuerdos que me encantaría escribir pero como los ponga aquí todos entonces esta tesis va tener 1000 páginas y tampoco es plan.

En primer lugar quería dar las gracias a Geli, a la doctora García-Pardo. Muchísimas gracias por darme la oportunidad de realizar mi trabajo en tu laboratorio, por abrirme las puertas del 142 cuando llegué, hace casi 7 años, recién salida del horno de la facultad de Biológicas de la UAM. Aun me rio recordando cuando a la semana de llegar al labo estaba corriendo uno de mis primeros geles de poliacrilamida en las antiguas cubetas y te dije, "Geli, que hago que se me está saliendo todo el agua!" y me dijiste "Estefi habla con propiedad es buffer!!!!" y ahora siempre digo buffer jajaja ;) Gracias por tu paciencia en mis momentos de caos y chotez y por apoyarme siempre. Hemos vivido muchos momentos juntas, malos, buenos, muy buenos, regulares...pero mis recuerdos serán siempre, geniales y positivos porque han sido más los buenos momentos que los malos. Gracias por darme la oportunidad de crecer como persona y a nivel académico.

Gracias a los doctores Pepe Garcia Marco y Maria Jose Terol por facilitarnos las muestras de sangre de los pacientes porque sin ellas esta tesis no hubiera sido posible, y por supuesto a los pacientes.

A los jefes de otros laboratorios: Dr. Joaquín Teixido, Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba, Dr Ignacio Casal, y Dr Jose Luis Rodriguez de Cordoba por los reactivos prestados y por su predisposicion a ayudarme siempre cuando lo he necesitado gracias por ser tan amables.

Al personal de los servicios del centro por la labor que realizan. en especial a Pedro Lastres (Citometría) y Maite y Gema (Microscopia confocal).

A los Doctores Juan Pablo Albar, German Rivas, Ghislain Opdenakker, Francisco Sanchez-Madrid y Santos Mañez, ya que indirectamente con la donación de sus reactivos han colaborado también en esta tesis doctoral.

De nuevo, al Doctor Ghislain Opdenakker por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio. A Jennifer mi guia en el Rega Institute. A Katrien por ser la Belga menos Belga que conozco.

Como no puede ser de otra manera, los siguientes a los que tengo que dar las gracias es a todos mis compis del 142. A los estaban cuando llegue y fueron mis primeros profes: Javi, Eli y Merce. A todos los que han ido pasando estos años por aqui: Cidonia, Bea, Sofia...Pero sobre todo a mi equipo AGP. Elvira, gracias por ser un ejemplo para mí en todos los aspectos

de la vida, a poca gente he conocido como tu, eres autentica, generosa, inteligente y siempre estás ahí para ayudar a todos, no sé que habría hecho sin ti en mis momentos de crisis absoluta, gracias gracias y gracias amiga. A Irene mi otra compi AGP, llevamos tantos muchos años juntas, sin ti no hubiera sido igual, das un toque especial a este labo y nadie tiene unas presentaciones power point tan bonitas como las tuyas, es imposible!!! y gracias por dejarmelas jajaja... A Mónica sexy, otra que siempre está ahí siempre ayudando a todo el mundo, nos conocemos desde hace poco pero te tengo un cariño enorme, nos hemos mondado tanto, con la caimada, con el álbum de fotos de Mariangelitas y muchas cosas jijj eres una tía guay!! A Mónica Aceves o palito palito, gracias por tu apoyo y por tus venga que no queda nada, siempre se agradecen en momentos de bajon :). A Emi, la pequeña por fuera y enorme por dentro, yo es que te quiero mucho Emi, ya te lo he dicho muchas veces, y te lo vuelvo a decir, eres de las top ten y punto en boca!! Y También a Nohemi nuestra nueva incorporación, llevas poco tiempo pero eres ya eres como de siempre :)

A mi segundo laboratorio, el laboratorio de Joaquin (o como yo le llamo con cariño Joaquinito). A Ana mi amiga , mi compañera de infinitos momentos, que pena me da que nos separemos tanto, te voy a echar mucho de menos. A Marta, que majísima que eres. A Soledad Giménez, la elegancia en persona. A Nohemi, la super mami de todos, yo flipo como se puede estar a todo como tu. A mi prima Alicia, ha sido corto pero intenso, tengo una nueva prima y encima me canta el porompompero, es genial. A Silvia, la chiquitita del labo, animo con todo. A los que se fueron David, Jan, a Geor de la jungla esa argentina que marco en el CIB y a mi Pablis precioso: eres de esas personas que van a estar siempre, me lo has demostrado durante todos estos años, hablo contigo cada 3 meses (si hay suerte) y es como si hablara todos los días, es genial. Y por supuesto también a Joaquin, por ser tan cercano y ayudarme siempre que lo he necesitado.

Al laboratorio de Santiago (mi tercer labo). A Sheili, que apaña eres, todo lo apañas y todo me lo vendes, jajaja que es broma, eres un solete de tía. A Agus (o Agustiniano), eres un tío genial, suerte con todo, como acabes en Japón y seas novel yo me mondo. A Ángela, gracias por siempre sonreír y reírte tanto, el mundo necesita más gente como tú que sonría. A Jawi (me he inventado tu nombre, pero sabes que eres tu jijj), siempre me dices "que envidia Tefi como sonries", que sepas que tú no te quedas corto y que molas! A Lucia, Jesus, Dani, y a Marta, siempre con buena cara cuando necesitaba algo :) y a Tami por supuesto, gracias por enseñarme tantísimo, mis primeras transformaciones, que hubiera hecho sin ti, gracias por San Sebastián, por hacerme reír con tus chotezes aunque no sé quién gana a quien.

Al laboratorio de Casal. A Rubén gracias por hacerme reír todos los días que me he cruzado contigo, sin duda siempre serás el que más mola y todos los demás siempre seremos los que antes molaban. A Irene mi compi de la uni la dulzura personificada eres un sol de persona. A Alberto que majete que eres. A Roi eres singular y especial gracias por ese abrazo que tanto me ayudo. A Silvia, eres una tía graciosa y cachonda donde las haya. Y al resto María, Beatriz, Rodrigo (que bueno eres).

A Josus cuantos momentos hemos pasado juntos, me has ayudado siempre tanto mil gracias Josus eres muy especial para mi y lo sabes. A Mariangeles que bien nos lo hemos pasado juntas, que bailoteos, esa viñacañera de moda que nunca olvidaré, a Eva hace mucho

que ya no estás pero cuando estas es como si no pasara el tiempo, a Gemita, que bonita eres, gracias por ayudarme tanto siempre, a la autentica Patri, a Panan, a Juande, por supuesto a mi Miguel, mi sabroso Mexicano, gracias por tus consejos, siempre tan objetivos, por tu sinceridad, esa que a veces corta, por las risas y confianzas, te echo de menos en el pasillo de aca pa ya.

Y a todos los demas, Mikel, Helga, Miguel, Lu, Roberto, etc etc seguro que me dejo a alguien...

Mis amigos de la Uni, Tere (mi amiguisima, mi compañera de prácticas, que buen equipo hacíamos madre mía), Albertito (salaaaa, majismo y to lo buenooo), Marta (toda la vida persiguiendonos la una a la otra, estoy convencida de que acabaremos en el mismo labo jajajaja), Lau (eres la elegancia personificada y el orden y organización y otra vez la elegancia), Nacho (la estrella musical), Sali (mi economista favorito te tengo un cariño muy especial), Cris (me caes taaaaan bien) Ire (ya te he escrito antes jeje venga aquí tambien guaaaapaaa)

A mis amigos de erasmus Silvia, Casi, Sergio, Javi, Ramón, Joserra, Sabelita

Ahora tocan MIS ROTONDOS, no hay nadie que os pueda superar... como vosotros no hay nadie, os quiero con locura. Gracias por hacerme desconectar siempre!! David gracias por esos primeros años, por apoyarme y quererme tanto, siempre serás parte de mi vida. Tere, mi "hermana", siempre has estado ahí desde que llegué a tres cantos, desde "hola soy nueva te quieres sentar conmigo?" ahí empezó nuestra amistad y creo que es infinita te quiero mil. Kni, gracias por tus consejos, son de esos que te hacen pensar y ver las cosas más claras y sencillas, eres capaz de quitarme la tontuna de la cabeza con una frase y eso no es moco de pavo, eres taaaaan especial para mi. A Alex mi amigo del alma, te adoro, que bien que voy a estar más cerca de ti. A Glory gracias por hacerme reir tanto, a tu lado todo es más positivo y alegre. A Dani Dani tu y yo sabemos lo que es esto, tu apoyo ha sido muy importante para mí, gracias precioso. A Xoxinaceo la autentica, como contigo no me rio con nadie eso está claro, gracias por enseñarme a darme cuenta de esas cosas que a veces dejo de lado. A Ari pequeñita y preciosa. A Willi por esos momentos mayumana que te marcas. A Esther, gracias por los partidos de padel y las que me vienen tan bien. Y a Maiquel, Paqui, Juan, Paola, Pablo Sanchez... Y a ti Barbi porque seguimos aprendiendo de ti aunque ya no estés con nosotros.

A mi Michis porque no se cómo se puede estar tan lejos y tan cerca a la vez. Gracias por aguantar mis lloreras sin entender nada de nada. Tu apoyo incondicional me ha llenado de fuerza para continuar, te quiero.

A mis padres, gracias a vosotros he llegado hasta aquí. Gracias por darme esta educación, os quiero muchísimo a los dos. Mama gracias por ser tan autentica, tienes esa manera de decir y hacer las cosas tan tuya, tan de mi mami, gracias porque sé que estas ahí siempre. Papi eres mi Papichulo ese que me llevaba a las tiendas a medir y luego me invitaba a desayunar sándwich mixto y batido de chocolate, los momentos que paso contigo me hacen muy feliz, porque eres mi papichulo precioso . A mis hermanos. Palmi gracias por entenderme tan bien, no hay nadie que lo haga como tú, te echo mucho de menos y te quiero más. Jose eres un cielo, y un torbellino, tienes tanta energía que dejas rastro por allí donde pasas, gracias

por hacerme reír tanto. A Andi que ya es parte de la familia, tu también sabes lo que es esto gracias por tus constantes palabras de ánimo "guapita". A mis tíos favoritos jajaja, sois como unos segundos padres para mí siempre estáis ahí cuando lo necesito. A mi tía Mar gracias por tu apoyo constante y por ser tan positiva siempre, voy a echar de menos nuestras escapadas. A mi tío Abel gracias por demostrarme tanto tu cariño y por decirme siempre no que luego es siempre si jiji. Evi mi pseudo hermanuchi eres muy especial para mí y te quiero mucho. A mis primos Virgi, David Esther y a todos los demás (que sois tantos) gracias por recordarme lo que es lo importante de la vida, gracias por vuestra sencillez y alegría, todos mis recuerdos con vosotros me sacan una sonrisa. y al resto de mi familia sois estupendos todos. Y a mi abu por ser la más bonita de todos.

Lo dicho:

GRACIAS A TODOS Y AHORA, QUE CONTINUE...

Índice

ÍNDICE

ÍNDICE.....	11
ABREVIATURAS.....	19
ABSTRACT.....	25
RESUMEN.....	29
INTRODUCCIÓN.....	33
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA LLC.....	35
Descripción general de la enfermedad.....	35
Características de las células LLC.....	35
Clasificación y diagnóstico	36
Sistemas de Rai y Binet.....	36
Marcadores pronósticos de la enfermedad.....	37
Origen de la enfermedad.....	37
Apoptosis en LLC.....	39
Anomalías genéticas.....	39
El microambiente en la patogénesis de la LLC	40
Tratamiento.....	42
Modelos animales de la enfermedad.....	43
Angiogénesis en LLC.....	43
VEGF.....	44
Adhesión y migración en LLC.....	45

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMPs).....	49
Características generales: Clasificación, estructura y función.....	49
MMP-9.....	52
Estructura de la MMP-9.....	52
Regulación de la MMP-9.....	53
Regulación transcripcional.....	53
Regulación del mRNA.....	55
Regulación por compartimentalización y secreción.....	55
Activación de la proMMP-9.....	55
Inhibición de la MMP-9.....	56
Función y papel de la MMP9 en diferentes procesos fisiológicos y patológicos.....	56
Procesos fisiológicos en los que interviene la MMP-9.....	57
Patologías asociadas a la MMP-9.....	58
Dominio Hemopexina de la MMP-9, PEX9.....	59
MMP-9 en LLC.....	60
OBJETIVOS.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
Cultivos celulares y purificación de células LLC.....	69
Anticuerpos, proteínas, soluciones, reactivos y péptidos.....	70
Citometría de flujo.....	73
Ensayos de unión soluble.....	73
Ensayos de adhesión celular.....	73

Ensayos de migración e invasión <i>in vitro</i>	74
Microscopía confocal.....	75
Western blot.....	75
Co-Inmunoprecitación.....	76
Zimografía.....	76
Ensayos de supervivencia celular.....	76
Silenciamiento de proteínas por siRNA.....	77
Vectores de expresión y purificación de proteínas de fusión a GST.....	77
Preparación del anticuerpo policlonal anti-P3.....	79
Análisis mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	80
Ensayos de invasión <i>homing</i> y migración <i>in vivo</i>	81
Análisis de la afinidad de unión soluble de los péptidos a las células LLC.....	81
Fraccionamiento núcleo citoplasma.....	81
Ensayos de xenotransplante e inhibición del crecimiento tumoral.....	82
Ensayo de formación de tubos con células HUVEC.....	82
Análisis estadístico.....	82
RESULTADOS	83
1. LA proMMP-9 SE UNE A CÉLULAS DE LLC A TRAVÉS DE LA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$ Y DE CD44 INHIBIENDO LA MIGRACIÓN CELULAR Y LA APOPTOSIS.....	85

<ul style="list-style-type: none"> La proMMP-9 es capaz de unirse a la superficie de las células de LLC a través del complejo de unión formado por la integrina $\alpha 4 \beta 1$ y el CD44v..... 	85
<ul style="list-style-type: none"> La unión de la proMMP-9 a la membrana celular de células LLC requiere de la presencia del dominio hemopexina PEX9 y da lugar a una inhibición de la migración transendotelial y de la apoptosis..... 	86
2. EL DOMINIO PEX9 DE LA (pro)MMP-9 SE UNE A CÉLULAS LLC A TRAVÉS DE LA INTEGRINA $\alpha 4 \beta 1$ Y REPRODUCE LAS FUNCIONES INDUCIDAS POR (pro)MMP-9 EN ESTAS CÉLULAS.....	90
<ul style="list-style-type: none"> El dominio PEX9 se une a células primarias LLC y a la línea celular MEC-1 de manera dosis dependiente a través de la integrina $\alpha 4 \beta 1$.... 	90
<ul style="list-style-type: none"> La unión del dominio PEX9 a las células de LLC provoca una inhibición de la migración celular <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>..... 	95
<ul style="list-style-type: none"> El cultivo sobre GST-PEX9 induce señales de supervivencia en células de LLC..... 	97
<ul style="list-style-type: none"> El PEX9 inhibe el crecimiento tumoral de xenotransplantes de células MEC-1..... 	98
3. CARACTERIZACIÓN DE LA UNION DE PEX9 A CELULAS DE LLC	99
<ul style="list-style-type: none"> Las células LLC son capaces de unirse a las construcciones GST-D1D2 y GST-D3D4 de PEX9 de manera independiente y a través de diferentes receptores. 	99
<ul style="list-style-type: none"> Las proteínas GST-D1D2 y GST-D3D4 inhiben la migración de células LLC..... 	102
4. IDENTIFICACION DEL SITIO DE UNION A LA INTEGRINA $\alpha 4 \beta 1$ EN LA REGIÓN D3D4 DEL DOMINIO PEX9.....	103
<ul style="list-style-type: none"> Identificación de una secuencia de unión a $\alpha 4 \beta 1$ en el subdominio D4 de PEX9 (péptido 3)..... 	103
<ul style="list-style-type: none"> El péptido P3 inhibe específicamente la unión de células LLC a proMMP-9 y GST-PEX9 pero no a otros ligandos de la integrina como VCAM-1. 	105
<ul style="list-style-type: none"> El péptido P3 inhibe la migración celular y la apoptosis 	106
<ul style="list-style-type: none"> Características bioquímicas de la unión de P3a a células LLC 	107
<ul style="list-style-type: none"> Un anticuerpo policlonal antiP3 inhibe la adhesión a PEX9 y la migración a través de células HUVEC..... 	109
5. IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN A CD44 EN LA REGIÓN D1D2 DEL DOMINIO PEX9.....	111
<ul style="list-style-type: none"> Identificación de secuencias funcionales en los dominios D1D2 de 	111

PEX9.	
• Efecto de los péptidos P6 y P7 en la adhesión de células LLC a ácido hialurónico y proMMP-9.	112
• IC-50 de los péptidos P6 y P7.....	112
• La combinación de los péptidos P3 y P6 aumenta la inhibición de la adhesión celular a GST-PEX9 y de la migración celular.	113
6. REGULACIÓN DE (PRO)MMP-9 POR VEGF EN CÉLULAS LLC.....	117
• VEGF disminuye la cantidad de (pro)MMP-9 en el sobrenadante de células LLC	117
• La inhibición de la producción de (pro)MMP-9 por VEGF se produce a través del receptor VEGFR2.....	118
• La disminución de (pro)MMP-9 por niveles elevados de VEGF se traduce en una disminución de la migración celular.....	119
• El factor de transcripción STAT-1 es el implicado en el bloqueo de la síntesis de MMP-9 por VEGF.....	119
7. REGULACIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS POR proMMP-9 EN CÉLULAS LLC	122
• Regulación transcripcional de proMMP-9 y VEGF por proMMP-9 y GST-PEX9 en células LLC.....	122
• integrina $\alpha 4\beta 1$ se asocia a VEGFR2 en células LLC.....	123
DISCUSIÓN.....	125
CONCLUSIONES.....	137
BIBLIOGRAFÍA.....	141
ANEXO	159
Anexo I.....	163
Anexo II.....	170
Anexo III.....	191

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADAMTS-4	Proteína disintegrina y metaloproteinasa con motivo trombospondina, <i>A desintegrin and metalloproteinase with trombospondin motifs-4</i>
APC	Célula presentadora de antígeno, <i>Antigen Presenting Cell</i>
APMA	Acetato de aminofebilmercurio, <i>4-aminophenylmercuric acetate</i>
APRIL	Ligando de inducción de la proliferación, <i>A proliferatin inducing ligand</i>
ATM	<i>Ataxia Talangiectasia mutated</i>
BAF	Factor de autointegración de barrera, <i>Barrier-to-autointegration factor</i>
BCA	Ácido Bicincónico, <i>Bicinchoninic acid essay</i>
BCECF-AM	Ester de 2'7'-bis(carboxietil)-5'(6')-carboxifluoresceinato-acetoximetilo, <i>2'7'-bis(carboxyethyl)-5'(6')-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XI	<i>B-cell lymphoma Extra Large</i>
BCR	Receptor de células B, <i>B-cell receptor</i>
BSA	Albúmina de suero bovino, <i>Bovine serum albumin</i>
CFSE	Carboxifluoresceina succidil ester, <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
DNA ADN	Ácido desoxirribonucleico, <i>Desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico, <i>Epidermal growth factor</i>
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares, <i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FAK	Quinasa de adhesión focal, <i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	Suero bovino fetal, <i>Fetal bovine surum</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos, <i>Fibroblast growth factor</i>
FISH	Hibridación in situ fluorescente, <i>Fluorescence in situ hybridation</i>
Fn	Fibronectina, <i>Fibronectin</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

GPI	Glicofosfatidilinositol, <i>Glycophosphatidylinositol</i>
GTPasa	Guanosina trifosfatasa, <i>Guanosine triphosphatase</i>
HUVEC	Célula endotelial de vena de cordón umbilical, <i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1, <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Inmunoglobulina, <i>Immunoglobulin</i>
IL	Interleuquina , <i>Interleukin</i>
IL-R	Receptor de interleuquina, <i>Interleukin receptor</i>
JAK	Quinasa Janus, <i>Janus kinase</i>
Lck	Proteína tirosina quinasa específica de linfocitos, <i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica, <i>Chronic lymphocytic leukemia</i>
LPA	Ácido lisofosfatídico, <i>Lysophosphatidic acid</i>
LRP-1	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas, <i>Lipoprotein receptor-related protein</i>
MAPK	Quinasa activada por mitógenos, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBL	Linfocitosis Monoclonal de células B, <i>Monoclonal B cell lymphocytosis</i>
MBP	Proteína de unión a maltosa, <i>Maltose-Binding Protein</i>
Mcl-1	Proteína de células leucémicas mieloides 1, <i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MEC	Matriz extracelular, <i>Extracellular matrix</i>
MMP	Metaloproteinasa de matriz, <i>Matrix metalloproteinase</i>
MSC	Células madre mesenquimales, <i>Mesenchymal stem cell</i>
MT-MMPs	Metaloproteinasa de matriz de membrana, <i>Membrane-type matrix metalloproteinase</i>
NF-kB	Factor nuclear kB, <i>Nuclear factor kB</i>
NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, <i>Neutrophil gelatinase associated lipocalin</i>
NLC	Células tipo nodriza, <i>Nurse like cells</i>
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida, <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>

PAR1	Receptor de activado por proteasas 1, <i>Protease activated receptor 1</i>
PBL	Linfocitos de sangre periférica, <i>Peripheral blood Lymphocytes</i>
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos, <i>Phosphate buffered saline</i>
PEX	Dominio hemopexina, <i>Hemopexin domain</i>
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-quinasa, <i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PKC	Proteína quinasa C, <i>Protein Kinase C</i>
PIGF	Factor de crecimiento de plaquetas, <i>Platelet growth factor</i>
RNA	Ácido ribonucleico, <i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	Ensayo de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa, <i>Reverse transcription-polimerase chain reaction</i>
SDF-1	Factor derivado de células estromales, <i>Stromal cell derived factor-1</i>
SDRA	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
SDS	Dodecilsulfato sódica, <i>sodium dodecyl sulphate</i>
STAT	Traductor de señal y activador de la transcripción, <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBP	Proteína de unión a la caja TATA, <i>TATA binding protein</i>
TBS	Solución salina tamponada con Tris, <i>Tris buffer saline</i>
TCR	Receptor de células T, <i>T-cell receptor</i>
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral β, <i>Tumor growth factor β</i>
Th	Célula T colaboradora, <i>T cell helper</i>
TIMP-1	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz, <i>Tissue Inhibitor of matrix metralloproteinases</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α, <i>Tumor necrosis factor-α</i>
TSP	Trombospondina, <i>Trombospondin</i>
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1, <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular, <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular, <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>

WT	Tipo salvaje, <i>Wild type</i>
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X, <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> .

Abstract

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation in the peripheral blood of CD5⁺ B lymphocytes and their progressive infiltration of the bone marrow and secondary lymphoid organs. These migration processes are mediated, among other molecules, by matrix metalloproteinases (MMPs). We and others have reported that proMMP (92 kDa) is the major MMP in CLL cells and plays an important role in CLL migration and invasion. Moreover, in contrast with normal B cells, proMMP-9 is present at the CLL cell surface. Using immunoprecipitation, cell fractionation and confocal microscopy we have demonstrated that $\alpha 4\beta 1$ integrin and 190 kDa CD44v constitute a docking complex for proMMP-9 in CLL cells. Binding of proMMP-9 to this complex inhibited cell migration and induced cell survival, thus contributing to CLL progression. Using proMMP-9 recombinant proteins containing deletions of various domains, we show that the proMMP-9 hemopexin domain (PEX9) is required for its interaction with CLL cells. Since this interaction may constitute a therapeutic target in CLL, and to help designing specific inhibitors, we have addressed its detailed study.

CLL cells bound to the GST-PEX9 fusion protein generated here, but not to GST, and this binding was primarily mediated by $\alpha 4\beta 1$ integrin. Upon the preparation of truncated GST-PEX9 forms containing the structural blades D1D2 or D3D4, we have demonstrated that CLL cells also efficiently bound to the GST-D1D2 and GST-D3D4 proteins and this binding involved two different receptors: GST-D3D4 primarily bound to $\alpha 4\beta 1$ integrin, while GST-D1D2 bound to CD44. Furthermore, both regions, D1D2 and D3D4 inhibited CLL cell migration. By preparing overlapping synthetic peptides spanning the entire PEX9 sequence, we identified two specific cell binding sites: The FPGVPLDHDVFQYREKAYFC sequence, located in D1 and contained in peptide P6 and the FDAIAEWIGNQLYFKDGKYW sequence, located in D4 and contained in peptide P3. Both peptides inhibited cell adhesion to proMMP-9 and GST-PEX9 as well as transendothelial migration. Moreover, combination of P3 and P6 synergistically increased the inhibitory effect of the individual peptides. Therefore, P3 and P6 could constitute excellent targets to prevent proMMP-9 contribution to CLL pathogenesis.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is also involved in the extravasation and survival of CLL cells. VEGF is a proangiogenic factor also produced by CLL cells and whose elevated levels correlate with bad prognosis. Our results have demonstrated that addition of VEGF to CLL cells significantly reduced proMMP-9 expression and in a dose-dependent manner. Inhibition of VEGFR2 blocked this effect, indicating that VEGF signaled through this

Resumen

RESUMEN

La leucemia linfocítica crónica B (LLC) se caracteriza por la acumulación en sangre periférica de linfocitos B CD5⁺ y su progresiva infiltración de médula ósea y órganos linfoides secundarios. En estos procesos de migración intervienen, entre otras moléculas, las metaloproteinasas de matriz (MMPs). Nuestro grupo, así como otros investigadores, ha demostrado que la proMMP-9 (92 kDa) es la principal MMP producida por células LLC y juega un papel esencial en la migración e invasión de células de LLC. Además, y a diferencia con linfocitos B normales, proMMP-9 está presente en la membrana de células LLC. Por medio de inmunoprecipitaciones, fraccionamiento celular y microscopía confocal hemos demostrado que la integrina $\alpha 4\beta 1$ y 190 kDa CD44v constituyen un complejo receptor de proMMP-9 en células LLC. La unión de proMMP-9 a este complejo inhibía la migración de células LLC e inducía supervivencia celular, contribuyendo por tanto a la progresión de la LLC. Utilizando proMMP-9 recombinantes con delecciones en varios dominios, hemos demostrado que el dominio hemopexina de proMMP-9 (PEX9) es necesario para su interacción con células LLC. Dado que esta interacción puede constituir una buena diana terapéutica en la LLC y con el fin de poder diseñar inhibidores específicos, hemos abordado su estudio en detalle.

Las células LLC se unían a la proteína de fusión GST-PEX9 generada en este estudio, pero no a GST, y esta unión era fundamentalmente mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$. Mediante la preparación de formas truncadas de GST-PEX9 que contenían los subdominios estructurales D1D2 o D3D4, hemos demostrado que las células LLC se unían también eficazmente a las proteínas GST-D1D2 y GST-D3D4 y que esta unión era a través de receptores celulares diferentes: GST-D3D4 interactuaba principalmente con la integrina $\alpha 4\beta 1$ mientras que GST-D1D2 se unía a CD44. Además, ambas regiones, D1D2 y D3D4 inhibían la migración de células LLC. Por medio de la preparación de péptidos sintéticos solapantes que abarcaban toda la secuencia de PEX9, hemos identificado dos sitios específicos de unión a células: La secuencia FPGVPLDHDVFQYREKAYFC localizada en el subdominio D4 y contenida en el péptido P3, y la secuencia FDAIAEWIGNQLYFKDGKYW del subdominio D1, contenida en el péptido P6. Ambos péptidos inhibían la adhesión celular a GST-PEX9 y proMMP-9 y la migración transendotelial. Además, la combinación de P3 y P6 aumentaba sinérgicamente el efecto inhibitorio de cualquiera de ellos. Los sitios P3 y P6 podrían constituir por tanto unas dianas excelentes para prevenir la contribución de proMMP-9 a la patogénesis de la LLC.

Otra molécula implicada en la extravasación y supervivencia de células LLC es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF es un factor proangiogénico que, al igual que

proMMP-9, es producido por células de LLC en niveles elevados, siendo un indicador de mal pronóstico. Nuestros resultados han demostrado que la adición de VEGF a células LLC reducía significativamente, y de manera dosis dependiente, la expresión de proMMP-9. Este efecto se bloqueaba inhibiendo VEGFR2, indicando que este era el receptor implicado en la señalización por VEGF. La disminución de proMMP-9 conllevaba una inhibición de la migración transendotelial o a través de Matrigel, confirmando el importante papel de proMMP-9 en estos procesos. Análisis por RT-PCR indicaron que la regulación de proMMP-9 por VEGF era a nivel transcripcional. De hecho, la interacción VEGF-VEGFR2 inducía la fosforilación del factor de transcripción STAT1 y el silenciamiento de STAT1 restauraba la producción de proMMP-9 y la migración de células LLC.

Dado que tanto VEGF como proMMP-9 son componentes abundantes del microambiente de la LLC hemos estudiado también la posible regulación de VEGF por proMMP-9. La incubación de células LLC con proMMP-9 aumentaba los niveles de VEGF a nivel transcripcional. Por el contrario, la incubación con GST-PEX9 disminuía la expresión de VEGF. Estos resultados fueron corroborados en ensayos de vasculogénesis, donde células LLC preincubadas con proMMP-9 aumentaron la formación de tubos en cocultivos con células HUVEC, mientras que la preincubación celular con GST-PEX9 inhibía la vasculogénesis. Adicionalmente, análisis por inmunoprecipitación indicaron una posible asociación entre los receptores de proMMP-9 ($\alpha 4\beta 1$ /CD44) y VEGF (VEGFR2), que podría conllevar una potenciación de la señalización intracelular y la expansión de células LLC. En conjunto, nuestros resultados aportan nuevas evidencias del papel patogénico de proMMP-9 y VEGF en la LLC y apoyan que ambas proteínas pueden ser buenas dianas terapéuticas en esta patología.

Introducción

LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Descripción general de la enfermedad

La leucemia linfocítica crónica (LLC) se caracteriza por la acumulación en sangre periférica de linfocitos B, en muchos casos $CD5^+$, que a medida que va progresando la enfermedad van infiltrando diferentes tejidos como la médula ósea o nódulos linfáticos (Figura 1) [1]. Es la leucemia más frecuente en adultos de países occidentales, representando alrededor del 30% de todas las neoplasias de tipo B. La edad media de los pacientes diagnosticados es de 65 años, con mayor incidencia en los varones (1,5:1). Algunas evidencias basadas en el estudio de familias con LLC en sucesivas generaciones sugieren que existe una susceptibilidad genética de la enfermedad [2, 3].

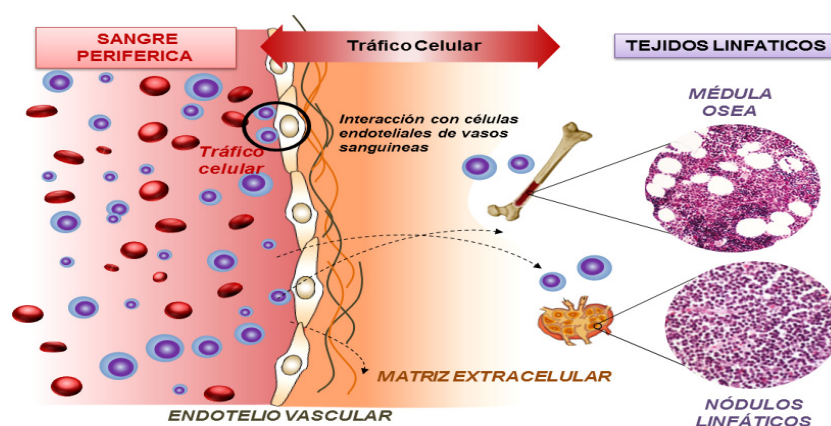


Figura 1: Tráfico de células LLC entre sangre periférica y tejidos linfoides.

Características de las células LLC

Las células LLC son maduras, están activadas y se caracterizan por una débil expresión de IgM, IgD y CD79b, y una expresión positiva para CD5, CD9, CD20, CD22, CD79a, CD23, CD43 y CD11c [4, 5]. La región variable de la cadena pesada de la Ig (IgVH) puede o no haber sufrido mutación, lo que incide también en el pronóstico de la LLC (Tabla 2). La señalización a través del receptor de células B (BCR) se encuentra muy alterada con respecto a los linfocitos B normales [6]. Aproximadamente el 80% de los linfocitos LLC expresan en su membrana inmunoglobulinas de superficie, por lo que se consideran de estirpe B pero con expresión de sólo una cadena ligera κ ó λ , fundamentando su clonalidad [1].

Clasificación y diagnóstico

La LLC es una enfermedad muy heterogénea, en general existen dos tipos de pacientes en función de la expectativa de vida en el momento del diagnóstico, algunos pacientes presentan una enfermedad poco agresiva y viven durante años con una enfermedad estable y sin medicación, otros mueren a los pocos meses aún bajo tratamiento quimioterapéutico [7-10]

a) Sistemas de Rai y Binet

A pesar de la heterogeneidad observada en la LLC, existen ciertas características comunes que pueden ser utilizadas para clasificar a los pacientes con LLC en estadios clínicos determinados. Los dos sistemas de clasificación más aplicados a nivel internacional son los descritos por Rai [11] y Binet [12] (Tabla 1). En el primero, los pacientes se dividen en tres grupos de riesgo: bajo (estadio 0), intermedio (estadios I y II) y alto (estadios III y IV). De manera análoga, la clasificación Binet agrupa a los enfermos en estadios A, B y C, siendo el C el más avanzado. Ambos sistemas se basan en la cantidad de linfocitos en sangre periférica y el grado de infiltración de células en los diferentes órganos linfoides. Estas infiltraciones dan lugar a las siguientes características clínicas: linfadenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia y/o trombocitopenia. En línea con la heterogeneidad mencionada existen además ciertos subgrupos de pacientes que difícilmente pueden ser encuadrados dentro de un estadio particular de LLC y se clasifican como LLC atípica.

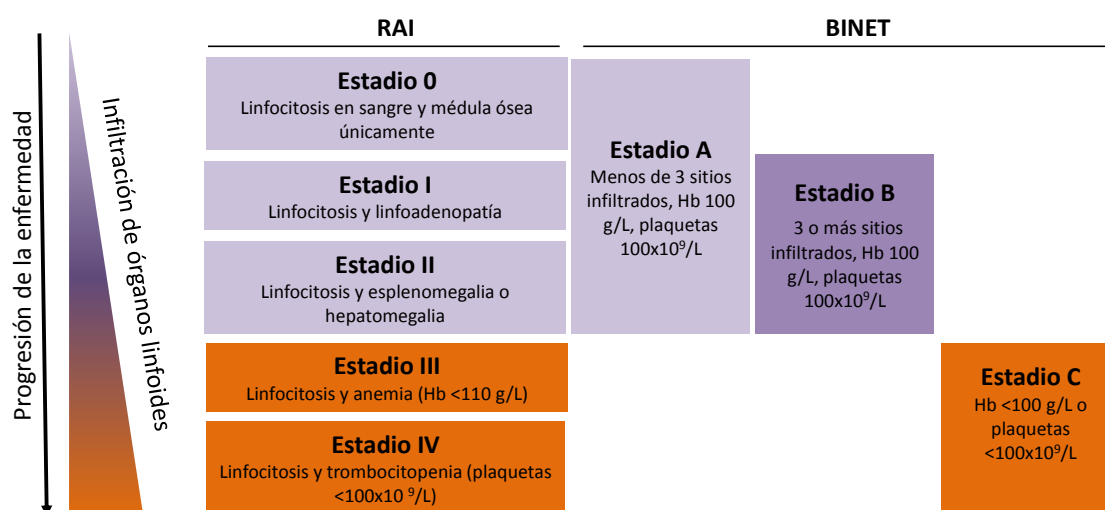


Tabla 1. Sistemas de clasificación de Rai y Binet para los estadios clínicos de la LLC. (Hb: hemoglobina).

b) Marcadores pronósticos de la enfermedad

Se han identificado algunas proteínas de membrana (Tabla 2) cuyos niveles de expresión correlacionan bien con el pronóstico de la LLC. Así, niveles elevados de CD38 o la integrina $\alpha 4\beta 1$, así como la presencia de la quinasa ZAP-70 suponen un mal pronóstico. Igualmente, la presencia de IgVH no mutada o de ciertas mutaciones/delecciones genéticas, como 17p13 correlacionan con una LLC más agresiva. [13, 14]. Se ha observado también una relación entre la alta expresión de algunos factores solubles como CXCL12, VEGF o proMMP-9 con una mala progresión de la enfermedad (Tabla 2) [15-17].

Mal pronóstico	Buen pronóstico
IgVH no mutada	IgVH mutada
Alta expresión de ZAP70 en membrana	Baja expresión de ZAP70 en membrana
Alta expresión de CD38 en membrana	Baja expresión de CD38 en membrana
Alta expresión de $\alpha 4\beta 1$ en membrana	Baja expresión de $\alpha 4\beta 1$ en membrana
Alta concentración de VEGF en sangre	Baja concentración de VEGF en sangre
Alta concentración de MMP-9 en sangre	Baja concentración de MMP-9 en sangre
Alta expresión de CCR7 y CXCR4	Baja expresión de CCR7 y CXCR4

Tabla 2. Marcadores de membrana celular y del plasma sanguíneo que indican buen o mal pronóstico de la enfermedad.

Origen de la enfermedad

El origen de la LLC ha sido muy discutido. Basándose en múltiples evidencias, como la diferente expresión de ciertos genes, la presencia o no de distintas mutaciones y la gran heterogeneidad observada entre los pacientes, hoy en día está descartado que la LLC tenga un único origen común. El reciente desarrollo de nuevas técnicas experimentales ha permitido generar una teoría que está bastante aceptada [18]. Se ha demostrado que las células preleucémicas MBL (leucemia B monoclonal) aparecen en un 13% de los casos de LLC y en los pacientes sanos sólo ocurre en un 3% de los casos. Además las características del BCR difieren considerablemente entre pacientes con el IgVH mutado (m-LLC) y no mutado (nm-LLC) de manera que, el estereotipo del BCR sugiere una evolución diferente entre las distintas subpoblaciones de LLC. Estudiando la expresión en los pacientes de RNAs de pequeño tamaño (miRNAs), se ha observado que existen anomalías en diferentes miRNAs en muchas LLC

siendo somáticas o codificadas en la línea germinal. Los cambios en la metilación en el DNA pueden ser transferidos verticalmente en individuos de la misma familia.

A través de análisis por microarrays, se ha comprobado que las células de nm-LLC presentan una mayor similitud a las poblaciones de linfocitos B $CD5^+$. De esta manera, la probabilidad de que el origen de la leucemia se de en esta población es bastante alta, a pesar de que las células $CD5^+$ no presentan mutaciones en la cadena pesada de las IgVH. Aun así, se ha descubierto una pequeña subpoblación de linfocitos $CD5^+CD27^+$ que presentan mutaciones somáticas en genes IGHV [19]. Por otro lado también hay que tener en cuenta los factores microambientales en los que se encuentran las células, que pueden generar y promover la adquisición de lesiones adicionales en las células B.

Considerando todos los puntos anteriores, existe una última hipótesis capaz de explicar la gran variedad de fenotipos celulares en las distintas LLC. El origen de la LLC puede ser un proceso secuencial en el que se requieren una serie de transformaciones eventuales a lo largo del tiempo, durante el cual, las células preleucémicas sobreviven en el microambiente que se encuentran. Primero, aparecería una lesión temprana en genes reguladores, de regulación epigenética o estructurales, que favorecería el crecimiento y la supervivencia. El momento dentro de la maduración del linfocito B en el que se produzca el daño, determinaría el fenotipo final de la LLC (Figura 2).

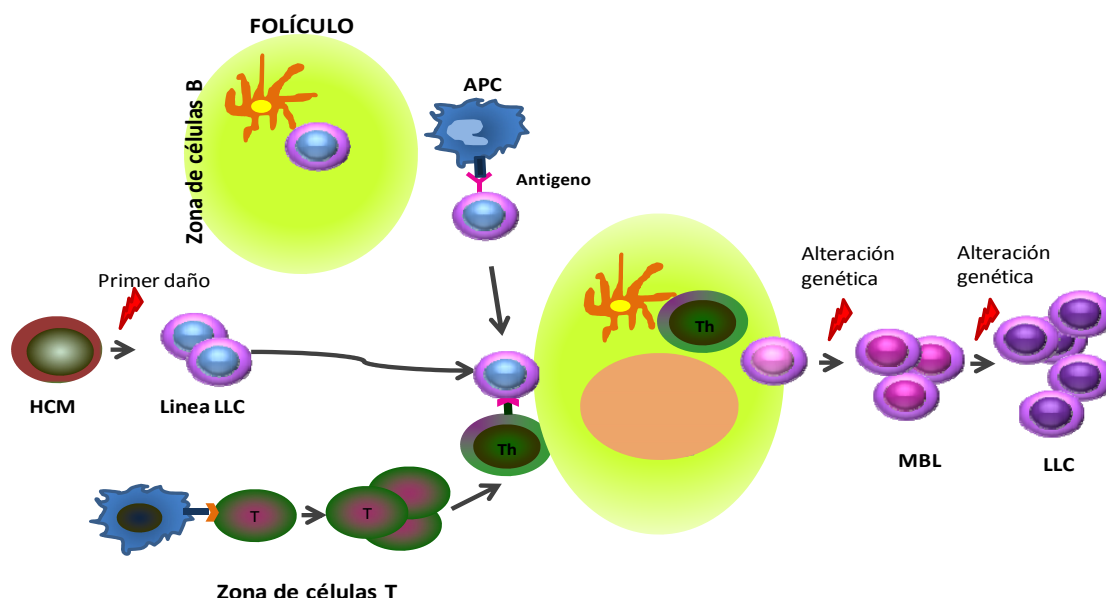


Figura 2. Esquema que representa las teorías actuales sobre el posible origen de la leucemia linfocítica crónica. APC (célula presentadora de antígeno), HCM (célula hematopoyética multipotente), Th (célula T helper ayudadora), MBL (leucemia B monoclonal).

Apoptosis en LLC

La mayoría de las células LLC se hallan en la fase G₀ del ciclo celular en el torrente sanguíneo, por lo que se pensaba que la LLC era más una enfermedad linfoacumulativa que linfoproliferativa, en la que existe un bloqueo de la apoptosis. Las células de LLC tienen constitutivamente activada la ruta PI3K/Akt y p38MAPK y la señalización por quinasas de la familia Src (Lyn, Lck) y su inhibición promueve la apoptosis celular [20-22]. Recientemente, se ha observado que Notch está constitutivamente activo en células LLC contribuyendo a su supervivencia [22]. Además, las células de LLC reciben señales de supervivencia a través de varias moléculas como las quimioquinas CXCL12, CCL19, CCL21, CXCL13, las citoquinas IL-4 y VEGF, los factores BAF y APRIL, cuando se unen a sus respectivos receptores. La señalización inducida por el BCR o el receptor CD40 también induce supervivencia de células de LLC. En todos los casos, estas activaciones promueven señales intracelulares (como la activación de PKC o PI3K) que inducen la expresión de proteínas antiapoptóticas como survivina, Bcl-xL, Bcl-2, XIAP o Mcl-1 [23-26].

La adhesión a células estromales o a endotelio, bien en reposo (a través de la unión ICAM-1/integrinas $\beta 2$) o bien activado (a través de VCAM-1/integrina $\alpha 4\beta 1$) incrementa también los niveles de supervivencia [27]. En general, la adhesión a células estromales favorece la supervivencia de células LLC a través de la inducción de Mcl-1 [28]. La adhesión de células LLC a proteínas de la matriz extracelular también promueve la supervivencia o su resistencia a tratamientos farmacológicos al aumentar los niveles de diversas proteínas antiapoptóticas [29, 30].

Por tanto, el microambiente en el que se encuentra la célula LLC favorece la supervivencia de las mismas a través de señales mediadas por moléculas solubles, por la adhesión a diferentes sustratos, o por la inducción de proteínas antiapoptóticas [31, 32].

Anomalías genéticas:

La anomalía cromosómica más común es la delección en 13q14.3, que ocurre en más del 50% de los enfermos de LLC, y se asocia con un buen pronóstico de la enfermedad. Estudios recientes han demostrado que esta región codifica para dos miRNAs, miR-15a y miR-16-1, los cuales regulan negativamente la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. [33]

Otra anomalía genética común en LLC es la delección de 11q22,-23 que provoca la pérdida del gen ATM (*Ataxia Telangiectasia mutated*). Esta proteína colabora en la regulación del ciclo celular y de proteínas supresoras de tumores como p53. Dado que p53 está implicado

en la reparación del daño al DNA, la pérdida de ATM conlleva la progresión de la enfermedad [34]. Además la expresión y/o función de p53 está también afectada en pacientes con delección en 17p13 (pérdida del gen TP53), que da lugar a la pérdida de expresión de p53 con las consecuencias mencionadas[35].

Por último hay que destacar los pacientes con trisomía del cromosoma 12 que presentan una enfermedad atípica, con un fenotipo celular poco común. Las células no expresan el marcador de membrana CD5, tienen el contorno nuclear irregular y expresan en la superficie celular la proteína FMC7, marcador poco común en esta leucemia. Se ha comprobado que la media de supervivencia de los pacientes con esta trisomía es mayor que los pacientes con delección en 17p o 11q23 y peor que los casos con delección en 13q14 [34]

El microambiente en la patogénesis de la LLC

Aunque inicialmente se pensaba que las células LLC no proliferaban, se ha comprobado que la longitud de los telómeros en células LLC es mucho menor que en linfocitos B normales, indicando que las células leucémicas han pasado por varios ciclos de proliferación [36]. Por otro lado, el hecho de que las células LLC mueran por apoptosis al ser cultivadas *in vitro*, sugiere la existencia de factores del microambiente *in vivo* capaces de favorecer la supervivencia y la acumulación del clon leucémico [8, 37, 38]. En los últimos años, estos factores en el microambiente celular están siendo muy estudiados, ya que su implicación en la malignidad de la enfermedad les hace buenas dianas terapéuticas. Se ha observado, que las células leucémicas reciben señales tanto en medula ósea y ganglios linfáticos, como en circulación, y dependiendo de cómo sean estas señales, se inducen diferentes respuestas, un aumento de la supervivencia o una inducción de la proliferación del clon de LLC [39].

Los leucocitos presentes en la circulación prolongan la supervivencia de las células LLC manteniéndose en fase G₀ mientras que se incrementa la población dentro de los centros proliferativos o pseudofolículos. Algunos de estos centros son los nódulos linfáticos o la medula ósea, en ellos, las células leucémicas reciben señales de linfocitos CD4 activados, células estromales y células de estirpe mieloide nodriza (nurse like cells, NLC) (Figura 3) [38].

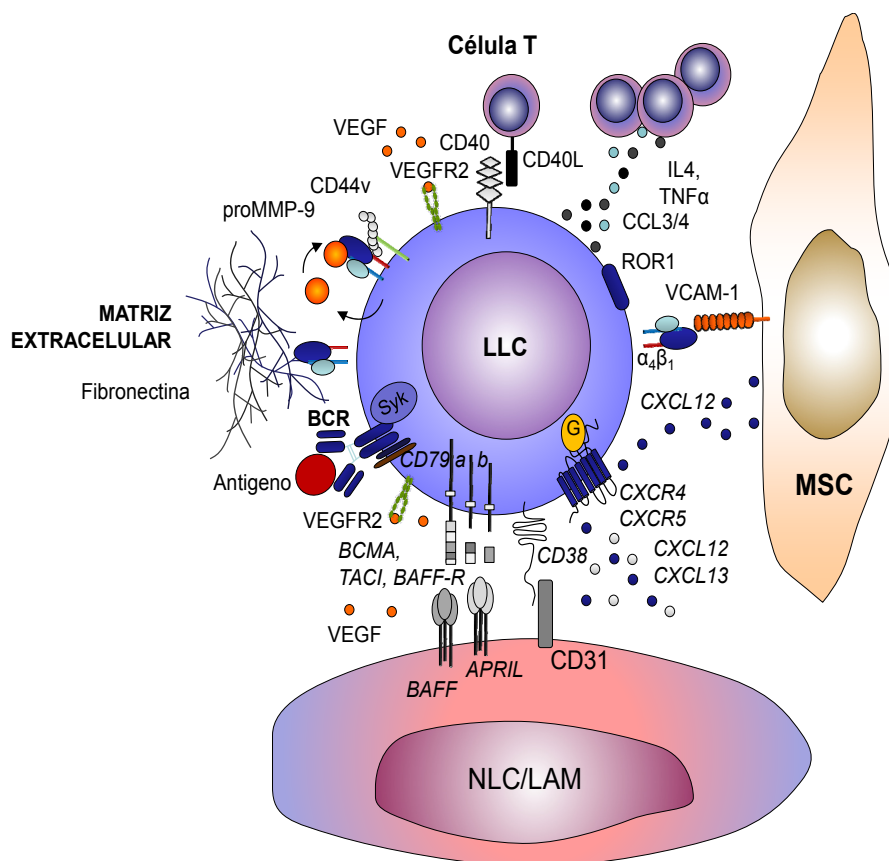


Figura 3. Interacciones de células LLC con su microambiente celular: Las células NLC expresan CXCL12 y CXCL13, y las MSC (células madre mesenquimales) CXCL-13 que se unen a sus receptores CXCR4 y CXCR5 en células LLC. La interacción entre MSC y LLC se produce a través de la integrina $\alpha_4\beta_1$ expresada en células de LLC, que interacciona con sus ligandos VCAM-1 y fibronectina. Células LLC interactúan con células T a través de la molécula CD40 (CD154), que se asocia a su ligando CD40L presente en células T. El VEGF y la proMMP-9 son secretadas por células endoteliales y las propias LLC [40].

La interacción de las células LLC con las células NLC y MSC se establece y mantiene a través de receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión. Las células NCL también secretan TNF α y otras citoquinas que inducen señales de supervivencia en las células LLC. Así en células LLC CD38⁺ esta molécula interacciona con su receptor CD31, presente en las células NLC y MSC, disparándose la activación de ZAP-70 y señales de supervivencia. La estimulación del complejo BCR (BCR/ CD79) induce señales que dan lugar a la activación de Syk y ZAP-70 y a la secreción de CCL3 y CCL4, potentes quimioatrayentes de las células T. Por tanto, las células de LLC atraen a células T e interactúan con ellas a través de la molécula CD40 que se une a su ligando CD40L (presente en células T). Esta unión provoca, un aumento de la expresión de moléculas de adhesión y de co-estimulación, induciendo proliferación, supervivencia e incrementándose la producción de distintas citoquinas, como IL-4 y TNF, que inducen también supervivencia en LLC [41]. Además, existen otros factores solubles implicados en la regulación de la supervivencia de las células LLC, como el ya mencionado VEGF [42] esencial para la resistencia a apoptosis en cultivos celulares o la proMMP9 [40].

Tratamiento

El tratamiento de la LLC ha sufrido múltiples cambios en los últimos años. Durante más de tres décadas el tratamiento estándar ha sido el clorambucilo (Clb) un agente quimioterapéutico alquilante, pero en los últimos años se han incorporado análogos de purinas, solos o en combinación con alquilantes, y más recientemente se han añadido a estas pautas anticuerpos monoclonales como el Rituximab anticuerpo anti-CD20. Este amplio arsenal terapéutico, junto con la heterogeneidad biológica de los pacientes, hace que sea difícil elegir un tratamiento concreto [43]. La elección del tratamiento dependerá de cada paciente, en función del estadio clínico, de la presencia de marcadores celulares de buen y mal pronóstico, de las alteraciones genéticas, la edad, además de la respuesta a un tratamiento previo en el caso que lo haya habido.

Normalmente, como tratamiento estándar se utiliza rituximab-fludarabina-ciclofosfamida (R-FC) o rituximab-bendamustina (R-B), pentostatina-ciclofosfamida-rituximab (PC-R) o fludarabina-ciclofosfamida-citoxantrona-rituximab (R-FCM) [44-46]. En los pacientes que presentan otro tipo de patología, se distinguen entre aquellos con anomalías graves y moderadas utilizándose R-Clb, R-B y B para los primeros y Clb para los segundos[46].

Los pacientes con mutación en p53 o delección en 17p son de alto riesgo porque tienen índices de respuesta muy bajos a los tratamientos y suelen ser tratados con rituximab-ciclofosfamida-adriamicina-vincristina-prednisona (R-CHOP) o R-FC [47].

En los últimos años están siendo estudiados un gran número de agentes potenciales en el tratamiento de la LLC. Se trata de agentes inmunomoduladores (como atalidomina y lenalidomina) [48][98], inhibidores de la familia de Bcl-2 (oblitersen u obatoclax) [49], inhibidores de proteínas quinasas (Flavopiridol) [50] e inhibidores de la angiogénesis y de la interacción de las células LLC con el microambiente celular. Los nuevos tratamientos que bloquean la angiogénesis, solos o en combinación con otros fármacos están teniendo muy buenos resultados, como el EGCG, el Vatalanib y el Pazopanib que inhiben la fosforilación de VEGFR1 y 2 y, en consecuencia inducen muerte en las células de LLC y no de linfocitos B normales [51, 52], y el Bezacizumab, un anticuerpo monoclonal frente a VEGF que está dando muchos resultados [53]. Como se ha comentado actualmente existen numerosas terapias en el tratamiento de la LLC pero son solo parcialmente eficientes. Por ello el descubrimiento y estudio de nuevos agentes terapéuticos, así como de nuevas dianas de ataque, son necesarias para intentar combatir y erradicar esta enfermedad.

Modelos animales de la enfermedad

Como en cualquier patología, los modelos animales que reproduzcan las características de la LLC, pueden ser muy útiles para el estudio del origen y la progresión de esta enfermedad [54]. Actualmente se han generado tanto ratones transgénicos como modelos de xenotransplante que asemejan aceptablemente las manifestaciones clínicas de la LLC.

a) Modelos de ratones transgénicos:

El primer ratón transgénico con características similares a la LLC se desarrolló expresando la proteína Tcl1 bajo el control del promotor de la IgHV (ratón E μ TCL1). Tcl1 es una proteína que funciona como co-activador de Akt [55] y está altamente expresada en las LLC más agresivas. En etapas iniciales los ratones E μ TCL1 presentan clones de linfocitos CD5⁺ en peritoneo y, a medida que se va desarrollando la enfermedad, las células CD5⁺ aparecen en el bazo y médula ósea. A pesar de ser un modelo que en un principio generó muy buenas expectativas, tiene algunas limitaciones. En primer lugar, la enfermedad dura solo entre 13 y 18 meses, por lo que el estudio de tratamientos a largo plazo no es viable. Además, la sobreexpresión de Tcl-1 no refleja la complejidad genética de la LLC. En los últimos años se ha observado que varios pacientes presentan una delección de 2 miRNAs (miR15a y miR16-1) [56], lo que ha llevado a la generación de nuevos modelos animales de LLC inhibiendo la expresión de estos miRNAs [57, 58].

b) Modelos de Xenotransplante.

La inyección de células LLC en ratones inmunodeprimidos ha sido muy útil para estudiar la progresión de la enfermedad y determinar cuándo se produce la primera mutación oncogénica. Además, estos modelos han servido para entender la influencia del microambiente, fundamentalmente, la importancia que tienen las interacciones entre las células T y las de LLC en la proliferación y en la infiltración de las células LLC en los diferentes tejidos secundarios [59, 60]. Por último, estos modelos también son muy útiles a nivel clínico para desarrollar nuevos fármacos y drogas que frenen o acaben con la enfermedad.

Angiogénesis en LLC

La angiogénesis es el proceso fisiológico encargado del crecimiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes. En individuos sanos la angiogénesis está presente durante el desarrollo embrionario, en procesos de cicatrización y en el embarazo. Este proceso juega también un importante papel en la tumorigénesis y en

metástasis. La angiogénesis está regulada por numerosos factores solubles y sus correspondientes receptores, existiendo factores pro y anti angiogénicos. En la LLC hay un aumento de la angiogénesis en médula ósea y ganglios linfáticos [61], ya que las células de LLC tienen la capacidad de secretar numerosas citoquinas angiogénicas como bFGF, VEGF, PlGF y TSP-1 [62-64].

a) VEGF

Es una glicoproteína ampliamente expresada en tejidos normales, capaz de inducir proliferación y migración de células vasculares endoteliales. La familia de VEGF comprende siete glicoproteínas denominadas VEGF A, B, C, D, E, F y el PlGF, que ejercen su función al unirse a sus correspondientes receptores VEGFR1, 2, 3 y neutrofilinas (Figura 4 y 5) [65].

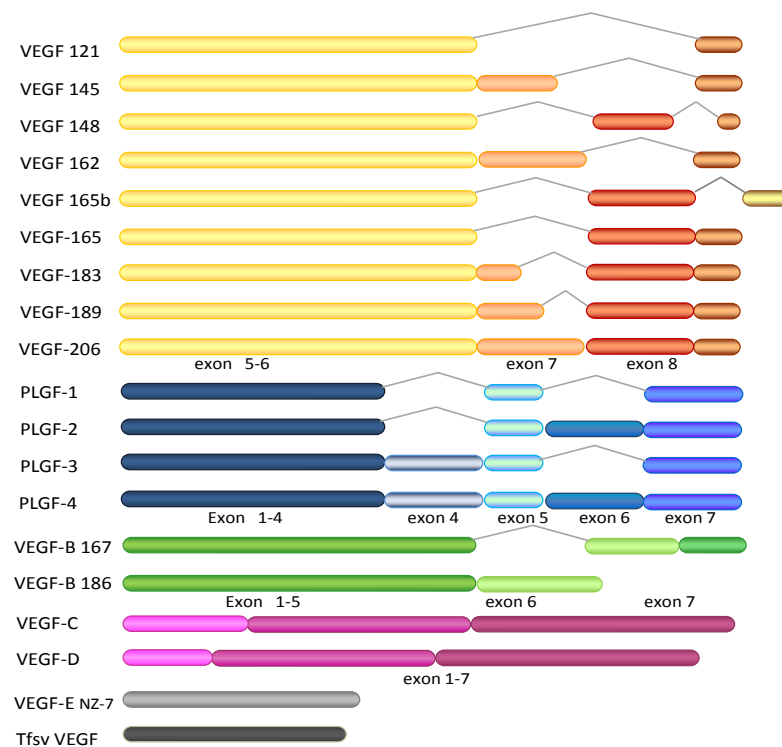


Figura 4. Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF.

Además de estar implicado en angiogénesis, juega un papel muy importante en supervivencia y migración celular.

Los receptores VEGFR1, 2 y 3 son receptores con actividad tirosin-quinasa que es regulada por la unión sus ligandos (VEGF) o por dimerización, ya que pueden homodimerizar o heterodimerizar entre ellos y con otras proteínas de membrana como PCAM 1 o integrinas. La activación de la actividad tirosin-quinasa da lugar a la activación de cascadas de señalización

intracelular como PI3K, p38/MAPK, que inducen proliferación celular, supervivencia, migración y por supuesto vasculogénesis y angiogénesis.

Las células de LLC expresan VEGF y VEGFR 1, 2 y 3 correlacionándose una alta expresión de estos factores con un mal pronóstico de la enfermedad. Son, por tanto, buenas posibles dianas terapéuticas. Además, estas células son capaces de responder a hipoxia e incrementar la secreción de VEGF. De hecho, el sobrenadante celular de LLC es capaz de promover el crecimiento de células HUVEC en ensayos con matrigel. Por otro lado, las células de LLC tienen constitutivamente fosforilado el receptor VEGFR-2, induciéndose la supervivencia al aumentar los niveles de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y XIAP [66, 67].

La interacción de las células de LLC con el microambiente promueve la secreción de VEGF, aumentando la angiogénesis e inhibiendo la apoptosis [68].

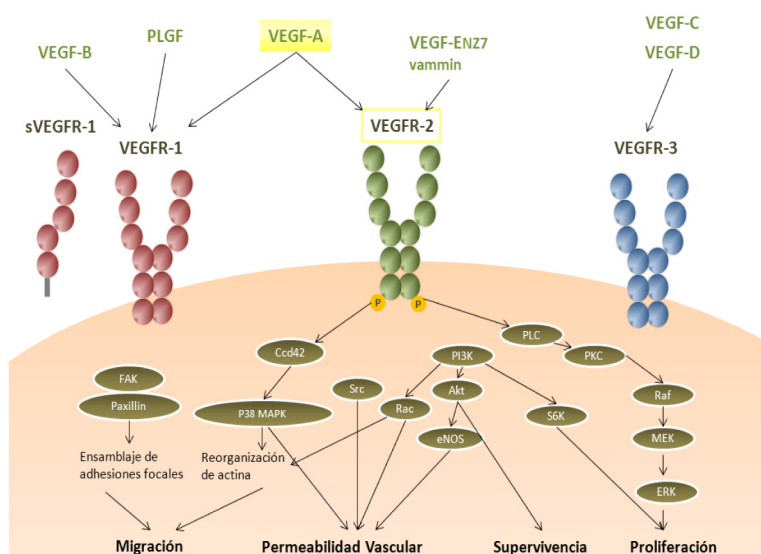


Figura 5. Receptores de la familia del VEGF y diferentes vías de señalización inducidas por estos factores.

Adhesión y migración en LLC

La infiltración de órganos por células LLC, es decir la progresión de la enfermedad, implica procesos de migración celular. Estos procesos siguen los mismos pasos descritos para leucocitos en general 1) *rolling* 2) adhesión firme a endotelio y 3) migración transendotelial [24, 69, 70], y están generalmente regulados por quimioquinas. El *rolling* esta mediado por selectinas mientras que en las otras dos fases intervienen las integrinas.

Las células LLC expresan generalmente [70] las integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ mientras que la expresión de $\alpha 4\beta 1$ es variable y $\alpha 5\beta 1$ $\alpha V\beta 3$ están ausentes [71, 72]. También expresan diversos receptores de quimioquinas fundamentalmente CXCR4, CXCR5 y CCR7 [73]. Estos receptores son plenamente funcionales, induciendo señales intracelulares que promueven la migración y supervivencia de las células LLC [74-76]. Tanto CXCR4, como su ligando CXCL12 suelen estar sobreexpresados en células LLC, correlacionándose con un mal pronóstico [77]

La integrina $\alpha 4\beta 1$ y la estimulación con quimioquinas juegan un papel fundamental en la activación de la integrina $\alpha L\beta 2$ y la GTPasa Rap1 en procesos de migración de células LLC [78]. Se ha demostrado que las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ son necesarias para la migración transendotelial bajo condiciones de flujo, y además, se ha descrito que ZAP-70 potencia la señalización inducida por los receptores de quimioquinas promoviendo la infiltración de células de LLC en tejidos secundarios [79, 80].

Una vez que la célula LLC ha cruzado el epitelio vascular se encuentra con la matriz extracelular que tiene que ser degradada para que la célula pueda avanzar. En este proceso se generan numerosas estructuras del citoesqueleto celular, como podosomas o invadopodia, en ellas se localizan moléculas de anclaje como CD44 o integrinas, así como metaloproteinasas de matriz (MMPs) que son esenciales en el proceso de invasión.

Se ha demostrado que existe una correlación entre los niveles de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en membrana y el mal pronóstico de la enfermedad como se ha descrito en los marcadores de pronóstico (Tabla 2). Además esta integrina es indispensable para la migración de las células LLC a la médula ósea [81]. Estos datos sugieren que integrina $\alpha 4\beta 1$ juega un papel muy importante en la malignidad de las células de LLC.

La integrina $\alpha 4\beta 1$ forma parte de la familia de las integrinas, son receptores de membrana que unen e integran el citoesqueleto celular con la membrana extracelular [82]. Las integrinas están formadas por la unión no covalente de dos subunidades denominadas α (de 120 a 180 KDa) y β (de 90 a 110 KDa). Ambas subunidades están compuestas por un pequeño dominio citoplasmático, una región transmembrana y un dominio extracelular [83]. La actividad adhesiva de las integrinas está altamente regulada y existen numerosos procesos que median su activación o desactivación. La capacidad de unir su ligando puede ser inducida mediante cambios en la afinidad y/o avidéz. Estos cambios dinámicos son debidos a estímulos recibidos por otros receptores de la superficie celular. Además, la unión del ligando a las integrinas origina señales que se transmiten al interior de la célula, señalización conseguida

mediante activación con anticuerpos o cationes divalentes [84-86]. Los cambios de avidéz, que implican la agrupación o *clustering* de integrinas gracias a la fluidez de la membrana plasmática, permiten la formación de interacciones adhesivas multivalentes entre las integrinas y sus ligandos, dando como consecuencia una mayor fuerza adhesiva conjunta [84, 87].

La integrina $\alpha 4 \beta 1$ o VLA-4 es la más expresada en linfocitos T y B, monocitos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, timocitos y progenitores hematopoyéticos [88, 89]. También es capaz de expresarse en otros tipos celulares como células de la cresta neural y otras células tumorales de origen no hematopoyético como el melanoma [90]. Esta integrina tiene una gran importancia en procesos inflamatorios, recirculación linfocitaria, hematopoyesis y organogénesis [88, 89]. Además, está implicada en la adhesión de progenitores hematopoyéticos al estroma de la médula ósea [91], juega un papel importante en patologías inflamatorias como asma bronquial, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y aterosclerosis, entre otras [88, 89], y podría también afectar al desarrollo de distintos tumores como la leucemia mieloide crónica [92], el mieloma múltiple [93, 94].

Las células de LLC expresan altos niveles del receptor CD44, tanto la forma estándar CD44H como la variable CD44v [95]. De hecho, se ha observado que pacientes con altos niveles de CD44 soluble en suero presentan un peor pronóstico de la enfermedad [96]. Esta proteína forma parte de una familia de glicoproteínas que actúan como receptores de glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico, aunque también se ha visto que pueden unir colágeno, laminina y fibronectina [97]. Es expresada en gran variedad de tipos celulares, incluidos la mayor parte de las células hematopoyéticas, queratinocitos, condrocitos, y también algunos tipos de células epiteliales, endoteliales y neuronales [98]. La complejidad de CD44 radica en que todas las isoformas provienen de un único gen, capaz de sufrir distintos *splicing* alternativos para dar lugar a las diferentes formas de CD44. La forma estándar de CD44 es la de menor peso molecular, y se expresa en la mayor parte de las células, consta de una región extracelular, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (Figura 6). En la región citoplasmática, CD44 es capaz de unir proteínas asociadas al citoesqueleto, como la ankirina, los miembros ezrina, radixin y moesina, PKC, la ruta de RhoA, o la señalización a través de Src quinasas como Lck, Fyn y Lyn [99]. Las isoformas variables de CD44 (CD44v), difieren de la forma estándar en que incluyen diferentes combinaciones de 10 exones variables, capaces de ensamblarse en un único sitio próximo a la membrana celular y dando lugar a las diversas formas de CD44v (Figura 12). Estas isoformas, se describieron en un

principio en diversos tipos de células tumorales, y especialmente en células con gran capacidad de metastatizar, aunque también se ha descrito un pequeño porcentaje de células normales capaces de expresar diversas formas de CD44v [100]. Además, CD44 es capaz de proteolizarse, liberándose de la membrana en forma soluble. Este dominio de CD44 soluble es capaz de acumularse en la matriz extracelular o en el plasma y fluidos, enviando diversas señales celulares [101].

CD44 resulta fundamental durante la morfogénesis, organogénesis, hematopoyesis y *homing* linfocitario, migración celular, activación linfocitaria, adhesión celular y apoptosis celular. Para llevar a cabo sus funciones, no solamente actúa como receptor celular para los distintos componentes de la matriz extracelular, también es capaz de actuar como plataforma para el anclaje de diversos factores solubles o metaloproteasas (como MMP-9 y MMP-7), lo cual favorece la migración dirigida por la célula [97, 102, 103].

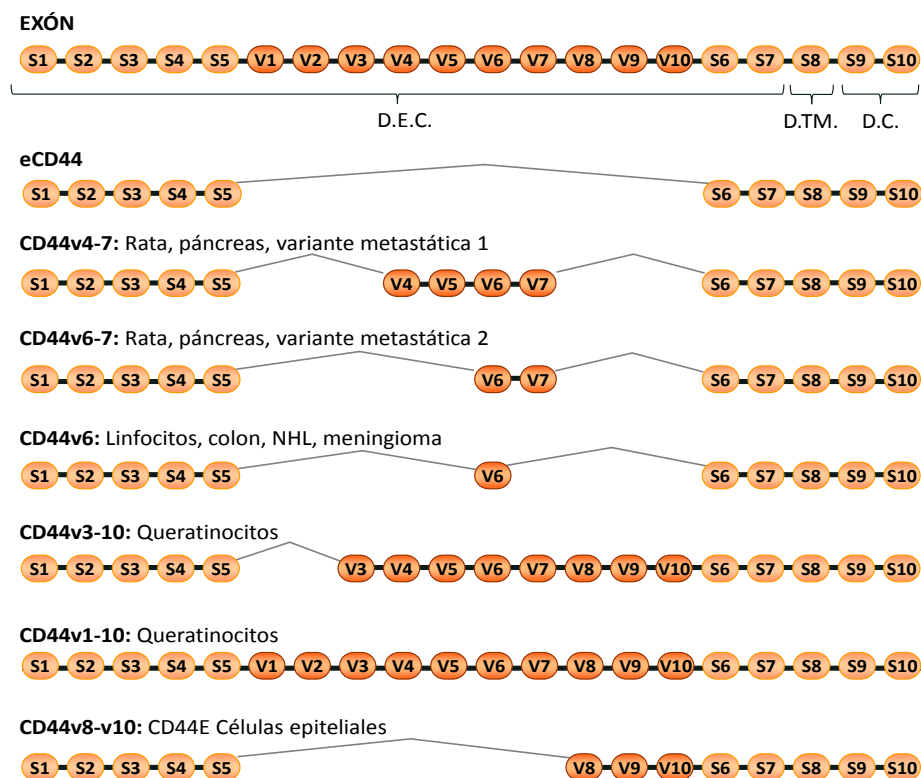


Figura 6. Diferentes isoformas de CD44 y células en donde se expresan principalmente.

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMPs)

Características generales: Clasificación, estructura y función

Las MMPs son enzimas implicadas principalmente en regular la integridad y la composición de la matriz extracelular, mediante el procesamiento o degradación de

numerosos sustratos pericelulares [104-106]. Las MMPs tienen especificidad de sustrato, aunque la mayoría presenta actividades redundantes y en conjunto son capaces de degradar casi todas las proteínas de la matriz extracelular. Además, estas enzimas son capaces de proteolizar otras muchas moléculas, tanto solubles, como presentes en la superficie celular, regulando así muchos otros procesos [107, 108]. Durante los últimos años se han descubierto nuevas funciones de las MMPs que son independientes de su capacidad enzimática [109].

La clasificación de las MMPs se realizó inicialmente en función al componente de la matriz extracelular que eran capaces de degradar [108, 110]. Así, las MMPs se agruparon en: colagenasas (MMP-1, -8, -13), gelatinasas (MMP-2, -9), estromilinas (MMP-3, -10, -11, -7) y matrilisinas. Con el descubrimiento de nuevos sustratos esta clasificación quedó obsoleta y actualmente las MMPs se clasifican según su estructura [109] existiendo ocho tipos estructurales diferentes, unas son solubles capaces de difundir por la matriz extracelular, y otras están ancladas a la membrana a través de dominios transmembrana (MT-MMPs) o glicofosfatidilinositol (GPI) (Figura 7).

Todas las MMPs presentan una estructura común en su región extracelular con cuatro dominios conservados: un péptido señal (aminoterminal), un propéptido o pro-dominio, un dominio catalítico y un dominio hemopexina (dominio PEX). El propéptido consta de unos 80-90 aminoácidos que contienen una cisteína conservada encargada de mantener la enzima en estado latente y que bloquea el zinc del sitio catalítico (Tabla 3). El dominio catalítico consta de unos 160-170 aminoácidos y contiene el sitio activo. Es una región muy conservada con tres histidinas (HEXXHXXGXXH) que coordinan un átomo de zinc dentro del dominio catalítico y una metionina conservada cercana al sitio activo cuya actividad catalítica depende del ión zinc y de calcio [111]. Por lo que la especificidad de los diferentes sustratos se determina probablemente mediante conformaciones específicas y regiones situadas fuera del sitio activo. El dominio hemopexina (PEX) está presente en todas las MMPs, excepto MMP7, MMP26 y MMP23 y contiene aproximadamente 200 residuos que conectan con el dominio catalítico a través de una región rica en prolina [112, 113]. El PEX regula la unión de la proteasa a distintos sustratos; a los inhibidores de MMPs, (denominados TIMPs), la unión de la MMP a la membrana celular y su posterior activación, y algunas actividades proteolíticas [114, 115].

ESTRUCTURA PROTOTIPO DE UNA MT-MMP	
CLASIFICACIÓN	ESTRUCTURA
TÍPICAS MMPs Colagenasas: Colagenasa 1 (MMP-1) Colagenasa 2 (MMP-8) Colagenasa 3 (MMP-13) Estromielisinas: Estromielisina 1 (MMP-3) Estromielisina 2 (MMP-10) Otras MMPs: Metaloelastasa (MMP-12) MMP-19 Enamelisina (MMP-22, C-MMP) MMP-27	
MATRILISINAS Matrilisina (MMP-7) Matrilisina 2 (MMP-2)	
GELATINASAS Gelatinasa A (MMP-2) Gelatinasa B (MMP-9)	
MMP-9 ACTIVADAS POR FURINA Secretadas : Estromielisina 3 (MMP-11) MMP-21 (X-MMP) Epilisina (MMP-28) Unidas a membrana: MT1-MMP (MMP-14) MT2-MMP (MMP-15) MT3-MMP (MMP-16) MT5-MMP (MMP-24) MT4-MMP (MMP-17) MT6- (MMP-25) MMP-23A MMP-23B	

Tabla 3. Estructura y clasificación de las MMPs: Se muestran los diferentes dominios estructurales: Péptido señal amino terminal que dirige la proteína hacia el retículo endoplasmático (pre), prodominio con el grupo de interacción zinc-thiol (SH), dominio catalítico con unión a Zinc (Zn²⁺), puentes disulfuro (S-S) dominio de unión colágeno II con repeticiones de fibronectina (Fn), motivo de reconocimiento celular para furina de proteasas de serina (fu), inserto de vitronectina (Vi), dominio transmembrana (MT), dominio citoplasmático (Cy), dominio unión a glicosfosfatidilinositol (GPI), dominio de cisteína (CA), dominio similar a la inmunoglobulina (Ig).

The diagram illustrates the six hallmarks of cancer, each represented by a colored box with a corresponding icon and a detailed molecular diagram.

- Inhibition of apoptosis (Green box):** Shows a cell undergoing apoptosis, with labels for IGF-BP, MMP, IGF, Integrin, TGF- α , and Latent TGF- β .
- Sustained proliferative capacity (Blue box):** Shows a cell undergoing proliferation, with labels for IGF-BP, MMP, IGF, Integrin, and Cleaved FASL.
- Self-sufficiency in growth signaling (Red box):** Shows a cell undergoing self-sufficiency in growth signaling, with labels for IGF-BP, MMP, IGF, Integrin, and Cleaved FASL.
- Evasion of growth suppressors (Purple box):** Shows a cell undergoing evasion of growth suppressors, with labels for IGF-BP, MMP, IGF, Integrin, and Cleaved FASL.
- Induction of angiogenesis (Orange box):** Shows a cell undergoing induction of angiogenesis, with labels for Perlecan, Col-IV, Fibrin, Plasminogen, Col-XVIII, Col-IV, Cleaved Col-IV, Integrin, VEGF, Angiostatin, Endostatin, Turnstatin, uPAR, Cleaved uPAR, TGF- β , FGF-2, Latent TGF- β , and MMP.
- Invasion and metastasis (Yellow box):** Shows a cell undergoing invasion and metastasis, with labels for CXCL12, Invasive cell, Cleaved Lam-5, ECM, Cleaved CXCL12, Lam-5, MMP-2, Cleaved CD44, Cleaved E-cad, and Cleaved TGF- β .

51

MMP-9

Estructura de la MMP-9

La MMP-9, o gelatinasa B, es similar estructuralmente a las demás MMPs pero posee características específicas que la hacen única y la confiere funciones especiales. El dominio hemopexina de la MMP-9 (PEX9) solo comparte entre un 25 y un 33% de homología con los dominios PEX de otras MMPs y juega un papel fundamental en la unión de la MMP-9 a otras moléculas como TIMP-1 y en la formación de multímeros de MMP-9. El PEX9 también está implicado en la unión de la MMP-9 a la superficie celular, por ello, en los últimos años ha recibido especial atención el estudio de este dominio (Figura 8).

Una característica específica de las gelatinasas es la región con tres dominios de unión a fibronectina tipo II [122, 123] que es capaz de unir gelatina (colágeno desnaturalizado), laminina y colágeno tipo I y IV [124]. Además, a diferencia de la otra gelatinasa (MMP-2), posee un dominio colágeno tipo V, que se encuentra altamente glicosilado (denominado dominio OG) [125-127] (Figura 8 A). Los azúcares de esta región (de tipo N- y O-glicosídicos) dan lugar a que se forme un puente disulfuro entre el dominio catalítico y el PEX9 [126, 128], el dominio OG confiere a la MMP-9 una mayor flexibilidad, pudiendo adquirir conformaciones que aumentan o disminuyen su capacidad de asociación con otras moléculas de la matriz extracelular [114].

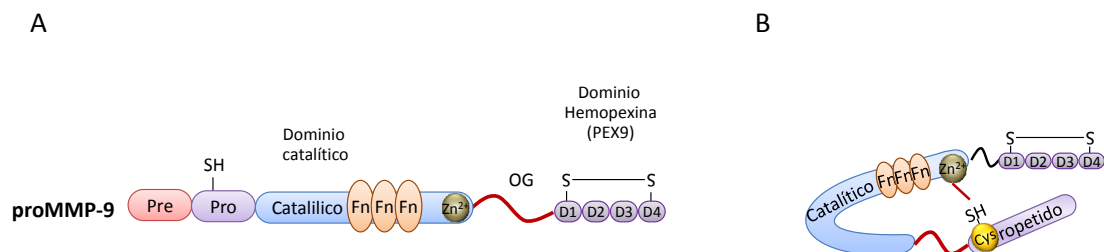


Figura 8. Estructura de la proMMP-9: (A) Esquema en el que se muestran los diferentes dominios de la MMP-9 (B) representación esquemática en la que se muestra la MMP9 inactiva (Pre) péptido señal, (Pro) prodominio, (Fn) dominios unión fibronectina, (OG) dominio o-glucosídico altamente glucosilado, (D1, D2, D3, D4) subdominios 1, 2, 3 y 4 del dominio hemopexina (PEX9)

La MMP-9 es susceptible a numerosas modificaciones post-transcripcionales que dan lugar un cambio en la actividad o en la función de la enzima. Su secuencia de aminoácidos presenta 17 residuos de cisteína, sin embargo sólo se forman 7 puentes disulfuro intramoleculares. En el dominio fibronectina existen dos puentes disulfuro necesarios para la secreción de la MMP-9 al exterior celular [129]. Otro de los puentes disulfuro se encuentra en el dominio hemopexina, entre el subdominio 1 y 4 [130]. También se pueden formar puentes disulfuro entre dos moléculas de MMP-9 para dar lugar a multímeros, a través de la cisteína

468 en el dominio O-glucosídico y la cisteína 674 en el dominio PEX9 [114]. La MMP-9 puede expresarse también como oligómero unida a otras moléculas como a la lipocalina NGAL (asociada a la gelatina de neutrófilos), presentando un peso molecular de 125kDa [131].

La MMP-9 completa presenta un peso molecular de unos 92 kDa, esta forma de MMP-9 tiene el prodominio por lo que se la va a denominar proMMP-9. Cuando la proMMP-9 es activada por proteólisis del prodominio pasa a tener un peso molecular de 85 kDa. Debido a que esta metaloproteinasa presenta O- y N-glicanos también es susceptible a diferentes glucosilaciones. En el retículo endoplasmático una forma de 85 kDa puede ser transformada por glucosilación a una forma intermedia de 89 kDa para posteriormente dar lugar a la forma madura de 92 kDa que presenta el prodominio (proMMP-9) [114, 132]. Además de la forma activa de 85 kDa, pueden aparecer otras formas de MMP-9 activada, por ejemplo, la activación por MMP-3 genera una forma de unos 65 kDa que no tiene ni el propéptido aminoterminal ni el dominio hemopexina [133, 134]. En el apartado de resultados vamos a utilizar indistintamente (pro)MMP-9, como término para referirnos tanto a la forma inactiva con el propéptido, como a la proteolizada activa sin el propéptido.

Regulación de la MMP-9

La expresión de la MMP-9 está muy regulada a diferentes niveles. En primer lugar el gen de la MMP-9 es transcrito en respuesta a diferentes señales celulares como activación de receptores celulares, hipoxia, etc. Seguidamente, existe una regulación post-transcripcional donde intervienen diferentes miRNAs dando lugar a la degradación del mRNA de la MMP-9. Tras ser traducida la enzima es acumulada en vesículas que se secretan en respuesta a determinados estímulos. Por último la proMMP-9 es activada para ser enzimáticamente funcional ya que es sintetizada como zimógeno. Una vez activa puede ser captada por sus inhibidores bloqueando su acción [135] (Figura 9).

a) Regulación transcripcional

El gen de la MMP-9 se encuentra en el cromosoma 20q11.2 y está principalmente regulado por diversas vías de activación a través de receptores de farnesoid, sensores metabólicos, integrinas, receptores de quimioquinas y receptores de proliferación celular, entre otros [136, 137] (Figura 9).

Una de los procesos más estudiados en este ámbito es la activación de la MMP-9 por citoquinas [138]. La transcripción de la MMP-9 también es inducida por factores de crecimiento,

b) Regulación del mRNA

En el caso del mRNA de la MMP-9, se ha observado que puede interactuar con el factor de unión a RNA nucleolin, cosa que no ocurre con el mRNA de la MMP-2 [142]. También se ha demostrado que la producción de MMP-9 puede aumentar drásticamente tras diferentes estímulos en fibroblastos HT1080, sin observar un aumento de los niveles de mRNA de MMP-9. Esto se debe a la unión del mRNA de la MMP-9 a proteínas de unión a RNA que transportan los RNAs mensajeros al retículo endoplasmático rugoso, donde aumenta la traducción a proteína de la MMP-9 [143].

c) Regulación por compartimentalización y secreción

Otra de las formas de regulación de la MMP-9 es a través de su compartimentalización en diferentes vesículas u orgánulos celulares que la acumulan y sólo la secretan en respuesta a determinados estímulos. Hay que destacar que el tráfico intracelular de la MMP-9 varía de un tipo celular a otro. En los neutrófilos, la MMP-9 es acumulada en granulocitos que son secretados automáticamente tras un estímulo inflamatorio [125]. En cambio, en macrófagos, la MMP-9 es sintetizada de nuevo tras un estímulo, de manera que su secreción es mucho más lenta [123, 135].

Una vez que la MMP-9 es secretada puede difundir entre los tejidos y la matriz extracelular o puede anclarse a receptores de la superficie celular como CD44, LRP-1, LRP-2, Ku e integrinas [114]. La unión a estos receptores puede provocar la activación de la MMP-9 y producir un direccionamiento de la degradación de la matriz por las células que la expresan.

d) Activación de la proMMP-9

Como todas las MMPs, la MMP9 se produce como zimógeno de manera que el propéptido que contiene la secuencia conservada PRCXXPD debe ser eliminado o retirado para que el dominio catalítico esté expuesto y la MMP-9 sea activa (Figura 10). *In vivo*, existen numerosas proteasas que activan la MMP-9 como kallikreina, tripsina, plasmina y otras MMPs como MMP-3, MMP-26 o la MMP-2 activa. De manera artificial e *in vitro*, puede ser activada por diferentes reactivos. El principal agente de activación es el *sodium dodecyl sulfato* (SDS) usado en zimografías para analizar la capacidad proteolítica de la proteína. También es muy utilizado el *4- minophenylmercuric acetaten* (APMA). La activación también puede ocurrir por agentes que modifican la afinidad entre los grupos tiol y por radicales de oxígeno. La MMP-9 y la MMP-2 pueden ser activadas *in vitro* en presencia de Metalotienin. Los cambios en condiciones físico-químicas como la temperatura o el descenso del pH pueden también activar estas proteasas (Figura 10) [136].

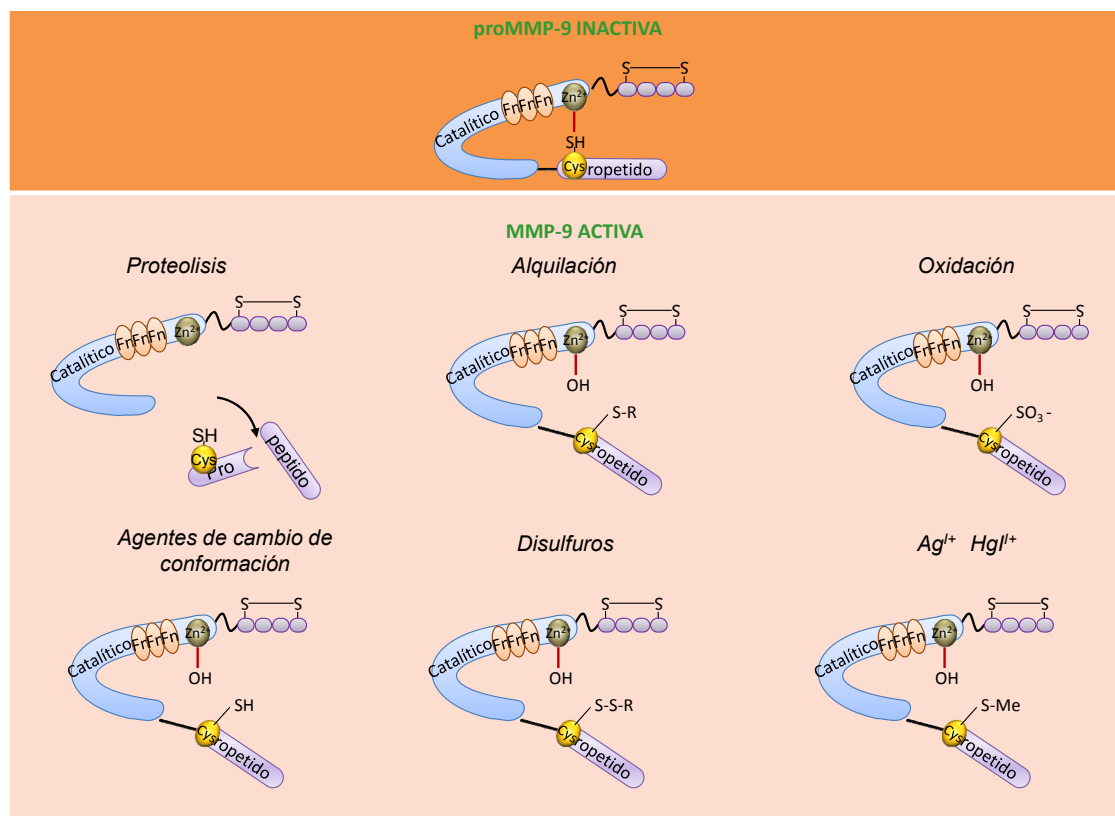


Figura 10. Procesos a través de los cuales se pueden activar las MMPs [144].

e) Inhibición de la MMP-9

La actividad catalítica de la MMP-9 puede ser bloqueada por diferentes inhibidores algunos comunes a todas las MMPs, como la $\alpha 2$ -macroglobulina y otros más específicos como el TIMP-1 que interacciona tanto con el PEX9 como con el dominio catalítico de la MMP-9. [134, 145].

Recientemente se han desarrollado números inhibidores químicos con el fin de tratar enfermedades en las que los niveles de esta enzima son significativamente muy altos como en los cánceres con alto porcentaje de metástasis. Algunas de ellos son la doxiciclina, la minociclina, y las tetraciclinas [146, 147].

Función y papel de la MMP-9 en diferentes procesos fisiológicos y patológicos

Al igual que el resto de las MMPs, la MMP-9 fue descubierta por su papel en la degradación de los compuestos de la matriz extracelular. En los últimos años se ha observado que también tiene la capacidad de procesar otras moléculas como las implicadas en adhesión (ICAM-1), receptores celulares (IL-2R α), citoquinas (pro-TNF- α , IL-1 β), factores de crecimiento (HB-EGF), proteasas (ADAMTS-4), proteínas de unión entre células (VE-Cadherina, ocludina) y proteínas estructurales (Sindecán-1, MBP, $\alpha\beta$ fibrilinas) [125].

Por otro lado, se han descrito recientemente nuevas funciones de la MMP-9 independientes de su actividad catalítica, en las que intervienen otros dominios estructurales. En este contexto la MMP-9 actuaría como ligando, activando o silenciando diferentes rutas implicadas en supervivencia celular o induciendo moléculas señalizadoras que inhiben la apoptosis de células tumorales (Figura 9) [148-151].

Además, la MMP-9 se localiza y por tanto, realiza su función en todos los compartimentos y orgánulos celulares. Se encuentra en lisosomas degradando cathepsina D, E, L1 y Z; en el núcleo regulando la ubiquitinación mediante el procesamiento de la enzima conjugada a la ubiquitina E2N; y por supuesto se encuentra como proteasa soluble en el citoplasma celular [125]. Una pequeña parte de la enzima puede estar anclada en la membrana de diversos tipos celulares no tumorales y tumorales, incluyendo células de LLC [122], desempeñando diferentes funciones. Los mecanismos que intervienen en este anclaje han sido descritos denominándose complejos de unión (*docking complex*), y son diferentes receptores o proteínas de la membrana celular. En células tumorales algunas de estas proteínas distintas isoformas variables de CD44, de integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, o la proteína Ku de reparación de ADN [102, 103, 152-155].

Debido a la gran variedad de sustratos de la MMP-9, esta gelatinasa participa en numerosos procesos fisiológicos y está implicada en numerosas patologías.

a) Procesos fisiológicos en los que interviene la MMP-9:

La MMP-9 está implicada en la remodelación del endometrio durante el ciclo menstrual femenino y durante el desarrollo embrionario [156, 157]

Por otro lado posee un papel muy importante en angiogénesis regulando factores tanto pro- como antiangiogénicos y en la remodelación de vasos sanguíneos y linfáticos. Se ha observado que ratones Knock-out MMP-9^{-/-} tienen un defecto en estos procesos [158, 159]. Estos ratones también presentan un crecimiento tardío en huesos y son un 10% más pequeños que en los ratones de tipo salvaje. Esto es debido a que durante el desarrollo embrionario existe una alta expresión de MMP-9 en los osteoclastos [160, 161].

En cuanto al mantenimiento de los tejidos, la MMP-9 está implicada en la migración de células troncales, células precursoras y de células del sistema inmune teniendo un papel clave en la regeneración epitelial, la cicatrización y la plasticidad sináptica neuronal (importante en los procesos de memorización y aprendizaje) [136].

Además tiene un importante papel durante los procesos de inflamación, ya que es altamente expresada y secretada por células del sistema inmune, promoviendo la movilización de células troncales a la médula ósea, o de linfocitos y leucocitos en respuesta a factores solubles de la inflamación [136].

b) Patologías asociadas a la MMP-9

La desregulación de esta proteína desemboca en numerosas patologías tanto inflamatorias, autoinmunes, como degenerativas. Así, un aumento de la MMP-9 y una disminución de TIMP-1 están asociados con una ruptura prematura de las membranas amnióticas. Además juega un papel importante en enfermedades inflamatorias pulmonares (SDRA síndrome de distres respiratorio agudo), gastrointestinales (enfermedad de Crohn), de la piel (dermatitis y psoriasis), articulares como artritis y en procesos inflamatorios de vasos sanguíneos y del sistema nervioso [125, 136].

Debido a su papel en la degradación de la matriz extracelular, se ha demostrado que la MMP-9 contribuye a los procesos tumorales, generando un ambiente propicio al degradar la membrana basal en las primeras etapas. También está implicada en procesos metastáticos más avanzados, induciendo la invasión de células malignas hacia los vasos para su diseminación a otros tejidos [136]. En los últimos años debido al descubrimiento de nuevos sustratos y nuevas funciones de la MMP-9, se ha visto que puede jugar un papel dual en la metástasis pudiendo inhibir este proceso en función de la concentración y de la localización celular de la proteína[162].

Dominio Hemopexina de la MMP-9, PEX9

Se trata de un dominio carboxi-terminal con 4 subdominios beta laminares. Presenta un puente disulfuro entre la cisteína 516 y la cisteína 704, conectando los subdominios 1 y 4. Esta unión es crítica para mantener la integridad estructural del dominio hemopexina (Figura 11) [130].

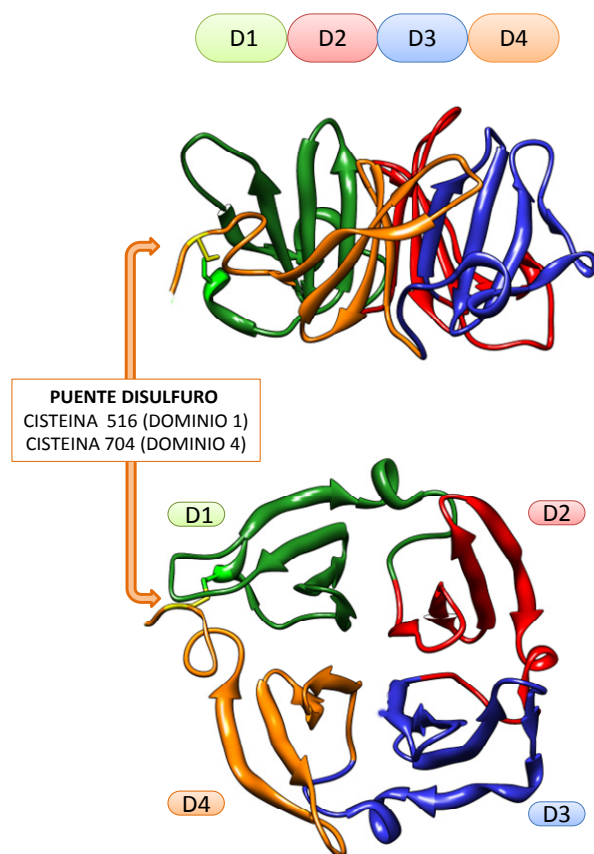


Figura 11. Estructura cristalina del dominio hemopexina de la MMP-9 (PDB 1ITV) D1, D2, D3 y D4 Subdominio 1, 2, 3 y 4 del dominio PEX9 [130].

Se han generado proteínas recombinantes del dominio hemopexina y se ha observado que puede estar presente como monómero y como dímero. La formación de dímeros no depende de puentes disulfuro, sino de interacciones hidrofóbicas entre las dos moléculas y por esta razón, se ha sugerido que es clave en la formación de multímeros de MMP-9 [130].

El dominio PEX9 une la MMP-9 a diferentes proteínas por lo que está implicado en numerosas funciones. Es el dominio responsable de interactuar con diferentes sustratos como gelatina, colágeno tipo I, tipo IV, fibrinógeno y elastina. La afinidad por estos sustratos es mayor cuando la MMP-9 no está activada y mantiene el propéptido [163, 164]. El PEX9 también media la unión de la MMP-9 con los inhibidores TIMP-1 y TIMP-3 pero la función exacta de esta unión aún no ha sido resuelta [145]. Es un dominio esencial en la endocitosis y

en el catabolismo de la MMP-9 debido a su unión a proteínas de la membrana celular como los receptores LRP-1 y LRP-2. También se puede unir al heterodímero Ku70/Ku80, que tiene como única función mantener la enzima en la superficie celular [114, 152, 165]. En los últimos años se ha descubierto que la MMP-9 tiene capacidad de autocatalisis cuando, a través del dominio hemopexina se une a otras proteínas como a la β -hematina [166].

Se ha demostrado que el dominio hemopexina de la MMP-9 puede jugar un papel muy importante en la regulación de procesos cancerígenos como la migración, supervivencia, angiogénesis y proliferación y que, dependiendo del tipo celular esta regulación puede ser positiva o negativa. El PEX9 es capaz de inhibir la migración de células de cáncer de colon metastásico (línea celular SW620) mientras que esto no se produce en las células de tumor primario que aún no se han movilizado a otros nichos (línea celular LS1749) [164]. Por otro lado, se ha observado que una delección del dominio hemopexina inhibe la inducción de la migración por MMP-9 en la línea celular de fibroblasto COS-1 [167]. También se han realizado estudios en células Schwann, donde PEX9 induce la migración y activa diferentes vías de señalización como Akt y Erk al unirse al receptor LRP-1 [168]. En modelos de xenotransplante de glioblastoma, el dominio hemopexina inhibe la angiogénesis y retarda el crecimiento [169]. Además se han generado diferentes compuestos cuya diana es el PEX9 y que son capaces de inhibir la migración celular [170].

MMP-9 EN LLC

Existen numerosos estudios indicando el importante papel de la proMMP9 en el progreso de la leucemia linfocítica crónica B. Trabajos previos han demostrado que las células LLC producen y secretan mayoritariamente la metaloproteinasa MMP-9, sin detectarse la presencia de MMP-2, MT-MMP-1 o el inhibidor de MMP-9 TIMP-1 [171, 172], además la proMMP-9 es expresada por las células de LLC a concentraciones mucho mayores en linfocitos B de individuos sanos [171, 173], de manera que altas concentraciones de proMMP-9 en el suero de los pacientes indican un mal pronóstico de la enfermedad [13, 17].

Otros datos que corroboran la importancia de esta enzima en el progreso de la enfermedad es que las células LLC presentes en sus nichos como médula ósea o nódulos linfáticos producen más cantidad de esta enzima [171, 173].

Se ha demostrado que la inhibición de la actividad enzimática de MMP-9 reduce la migración a través de colágeno de tipo IV o de monocapas de células endoteliales [173], que el tratamiento con interferones, o el bloqueo del VEGF y TNF- α endógeno de las células LLC

disminuye la síntesis de MMP-9 por estas células. Además, la expresión constitutiva de MMP-9 en células LLC parece estar regulada por la señalización inducida por p38MAPK, y la inhibición de esta ruta reduce la expresión de la metaloproteinasa [151].

En nuestro laboratorio se ha demostrado la importancia de esta enzima para la migración de las células LLC ya que inhibiendo in vitro la proMMP-9 endógena, se bloquea la invasión celular [172]. Además la producción de proMMP-9 se incrementa en las células LLC tras la estimulación de la integrina $\alpha 4\beta 1$, y los receptores de quimioquinas CCR7 y CXCR4 [172, 174]. También se ha descrito que la MMP-9 puede localizarse en la membrana de células LLC a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y la molécula de adhesión CD44 y que esta asociación inhibe la migración celular y genera una señalización intracelular, induciéndose una inhibición de la apoptosis [40]



Objetivos

OBJETIVOS

proMMP-9 es capaz de unirse a células LLC y regular su migración y supervivencia, contribuyendo por tanto a la progresión de la LLC. Con el fin de ayudar al diseño de posibles inhibidores que bloquearan esta interacción y sus consecuencias funcionales, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar la unión de proMMP-9.

- 1.1 Determinación de los receptores implicados
- 1.2 Análisis de los efectos funcionales derivados de esta unión
- 1.3 Identificación de los sitios de proMMP-9 responsables de su interacción con células LLC

2. Analizar la posible regulación recíproca entre VEGF y proMMP-9, ámbas abundantes en el microambiente de la LLC.

- 2.1 Regulación de proMMP-9 por la unión de VEGF a sus receptores celulares
- 2.2 Estudio de la posible regulación de factores angiogénicos por proMMP-9 y PEX9

Materiales y Métodos

Cultivos celulares y purificación de células LLC

Las líneas celulares humanas, K562 y K562- $\alpha 4$ y las células LLC primarias se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowhittaker, Verviers, Bélgica), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina (Gibco Invitrogen o Lonza). La línea celular MEC-1 fue cultivada en medio IMDM (Lonza, Basel, Suiza) con un 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina (Gibco Invitrogen).

Los linfocitos de leucemia linfocítica crónica se aislaron de la fracción mononuclear de sangre periférica de donantes con esta patología utilizando un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). En los casos en los que la población de linfocitos B fue menor a 80% (detectados por citometría de flujo marcando el con un anticuerpo anti-CD19) se purificaron mediante selección negativa usando *bol*as magnéticas (Dynal ASA, Oslo, Noruega) conjugadas con anticuerpos anti-CD3. Las características de los pacientes utilizados en esta tesis doctoral se detallan en la Tabla 4:

Características clínicas de los pacientes					
Paciente	Sexo/Edad	Estadio	CD38/ZAP70 ^b	$\alpha 4$ (%)	Estado Ig
1	M/56	B/I	-/-	ND	Mutado
2	M/34	B/I	-/+	ND	Mutado
3	M/62	A/0	+/+	ND	No mutado
4	F/65	A/0	-/+	71	No mutado
5	M/75	A/0	+/+	65	No mutado
6	M/72	A/0	-/ND	ND	ND
7	F/75	B/II	+/+	ND	No mutado
8	F/49	A	-/-	ND	Mutado
9	M/83	B/II	+/-	25	No mutado
10	M/65	A	-/ND	ND	ND
11	F/65	B/II	-/ND	ND	ND
12	F/73	A/II	-/+	73	Mutado
13	M/51	B/II	-/ND	ND	Mutado
14	M/63	B/II	+/+	35	ND
15	M/77	A/0	-/-	ND	Mutado
16	F/67	B/II	-/ND	71	ND
17	F/54	B/II	-/ND	55	No mutado
18	M/43	A/0	-/-	29	Mutado
19	M/81	A/0	-/ND	57	Mutado
20	M/56	C/IV	-/-	88	No mutado
21	M/58	B/II	+/+	48	No mutado
22	M/67	B/II	- +	20	Mutado
23	M/69	C/IV	+/+	37	ND
24	F/83	C/IV	-/+	74	Mutado

Paciente	Sexo/Edad	Estadio	CD38/ZAP70 ^b	$\alpha 4$ (%)	Estado Ig
25	M/70	B/II	+/+	75	No mutado
26	M/64	A/I	-/-	78	Mutado
27	M/80	A/I	-/+	81	No mutado
28	M/77	B/I	+/+	82	ND
29	M/83	B/II	+/+	43	No mutado
30	M/68	B/II	-/+	12	Mutado
31	M/59	C/IV	+/+	30	No mutado
32	M/85	C/IV	+ /ND	25	Mutado
33	F/73	A/II	-/-	76	Mutado
34	M/60	A/0	+/-	37	ND
35	M/69	C/IV	-/+	74	ND
36	M/70	B/II	+/+	75	No mutado
37	M/79	B/II	+/-	43	No mutado
38	M/68	B/II	- /ND	12	ND
39	M/59	C/IV	+/+	30	No mutado
40	M/64	A/I	+ /ND	35	Mutado
41	M/48	B/I	+/+	10	ND
42	F/54	A/0	+ /ND	93	No mutado
43	M/68	ND	+ /ND	36	ND
44	ND	ND	+ /ND	99	ND
45	F/70	C/IV	+ /ND	80	ND
46	M/66	B/II	+/+	91	ND
47	M/63	B/II	+ /ND	61	ND
48	F/69	C/IV	+ /ND	99	ND
49	M/62	ND	+ /ND	90	ND

Tabla 4: Pacientes utilizados en esta tesis doctoral y características clínicas más relevantes.

F=Femenino (Female), M= Masculino (Male) ND=no determinado

Las células endoteliales procedentes de cordón umbilical humano (HUVECs) fueron obtenidas de DMSZ, Lonza y se cultivaron sobre una base de gelatina al 0,2% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), en Medium 199 (Gibco Invitrogen) suplementado con un 15% FBS, 5% de heparina y 50 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) preparado a partir de cerebro bovino.

Anticuerpos, proteínas, soluciones, reactivos y péptidos

a) Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en este trabajo se muestran en la siguiente Tabla (Tabla 5):

NOMBRE	PROCEDENCIA
Actin (3853)	Sigma
Alexa 488, 568	Molecular Probes
CD19	Diaclone (Besançon, France)
fosfo-Lyn Tyr396	Abcam
f-STAT1 Tyr701 (sc-8394)	Santa Cruz Biotechnology
GST (sc-459)	Santa Cruz Biotechnology
Histona H4	Upstate
HP1/2 (anti-alpha4)	Dr Francisco Sanchez Madrid
HP1/7 (anti-alpha4)	Dr Francisco Sanchez Madrid
HP2/9 (anti-CD44)	Dr Francisco Sanchez Madrid
HRP-labeled Ac	Dako
Lyn (2732)	Cell signalling
Mcl-1 (sc-819)	Santa Cruz Biotechnology
MMP-9 (sc-6841R)	Santa Cruz Biotechnology
P1D6 (anti-alpha5)	Dr Francisco Sanchez Madrid
STAT1 (sc-464)	Santa Cruz Biotechnology
TS2/16 (anti-beta1)	Dr Francisco Sanchez Madrid
VEGFR2 (flk) (sc-504)	Santa Cruz Biotechnology
CD 19	Diaclone
CD 5	Genprobe

Tabla 5. Anticuerpos utilizados.

b) Reactivos:

Reactivos	Casa comercial
Acido Hialuronico	Sigma
Ampli Taq polimerasa	Applied Biosystems
BCECF-AM	Molecular Probes
CXCL-12 (SDF-1)	R&D systems
Fibronectina	Purificada como se ha descrito[175]
Gelatin	Sigma-Aldrich
Glutation agarose-Matrix	Sigma
Hiperfect Transfection Reagent	Qiagen
Inhibidor VEGFR2	Calbiochem
Matrigel	BD Biosciences
Nanosep 3K	Pall &co
pGEX4T3 vector	GE Healthcare
PIGF	Peptotech
proMMP-9	THP-1 cells

proMMP-9	Calbiochem
Protein A sepharose column	GE Healthcare
siRNAs	Ambion
TNF-α	R&D systems
TNF-α	R&D 210TA
Transwell filters	Costar
VCAM-1	R&D systems
VCAM-1	Purificada como se ha descrito [176]
VEGF	Peprotech

Tabla 6. Reactivos y la casa comercial donde se obtuvieron.

c) Péptidos:

Los péptidos y sus secuencias utilizados en este trabajo, marcados o no con 5(6)-carboxifluoresceína, se encuentran en la Tabla 7 y fueron generados a través de un sintetizador automático (AMS 422, ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld, Germany).

Péptidos CS1 y CS3	Secuencia de amino ácidos	500μg/ml=μM
CS1	LVTLPHPNLHGPEILDVPST	183,0
CS3	TSGQQPSVGQQMIFEEHGFR	183,0
Péptidos derivados de D3D4		
P1 (621-640)	RGKMLFSGRRLWRFDVKAQ	202,8
P2 (638-657)	KAQMVDPRSASEVDRMFPGV	225,2
P3 (654-674)	FPGVPLDTHDVFQYREKAYFC	197,5
P4 (672-691)	YFCQDRFYWRVSSRSELNQV	193,5
P5 (689-707)	NQVDQVGYVTYDILQCPED	227,3
Péptidos derivados de P3		
P3a	FPGVPLDTHDVFQYREK	244,1
P3b	PLDTHDVFQ	427,4
P3arv	KERYQFVDHTDLPVGPF	255,1
P3am	FPGVPLATHAVFQYREK	244,1
Péptidos fluoresceinados derivados de P3, CS1 y CS3		
CF-P3a	CF-FPGVPLDTHDVFQYREK	215,7
CF-P3am	CF-FPGVPLATHAVFQYREK	207,8
CF-CS1	CF-LVTLPHPNLHGPEILDVPST	199,4
CF-CS3	CF-TSGQQPSVGQQMIFEEHGFR	190,8
Péptidos derivados de D1D2		
P6 (523-543)	FDAIAEIGNQLYLKDGKYW	254,9
P7 (540-559)	KYWRFSEGRGSRPQGPFLLIA	209,0
P8 (557-576)	LIADKWPALPRKLDVFEER	212,5
P9 (574-590)	EERLSKKLFFFSGRQVWVYT	209,7
P10 (588-608)	VYTASVLGPRRLDKLGLGA	198,3
P11 (606-621)	LGADVAQVTGALRSRGK	244,6
Péptidos derivados de P6		
P6rv	WYKGDKFLYLQNGIEAIDF	254,9

Tabla 7. Péptidos: CF:5(6)-carboxifluoresceína. D: Dominio, P: Péptido, rv: reverse invertido, m: mutado.

Citometría de flujo

1 x 10⁵ células de LLC fueron incubadas durante 30 min a 4°C con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína en el buffer de citometría (BSA 1%, Ácido Sódico 10mM, PBS 1x) en el caso de anticuerpos policlonales de conejo se añadió gammaglobulinas humanas (10 µg/ml) con el fin de bloquear y evitar las uniones inespecíficas. Tras un paso de lavado mediante centrifugación en PBS frío, las células se incubaron durante 30 min a 4°C en oscuridad con los anticuerpos secundarios conjugados con FITC (Molecular Probes, Eugene, OR.), analizándose finalmente en un citómetro de flujo (Coulter Epics XL).

Ensayos de unión soluble.

1 x 10⁵ células de LLC fueron incubadas con las proteínas a estudiar (0.4 µM Y 0.6 µM de GST-PEX9, GST-B1B2, GST-B3B4 para LLC Y MEC-1 respectivamente, 120nM de proMMP-9) durante 30 minutos a temperatura ambiente en el medio de citometría (BSA 1%, Ácido Sódico 10 mM, PBS 1x). Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína durante 30 minutos a 4°C y a continuación con los anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos correspondientes durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas en superficie se detectaron mediante citometría de flujo.

Ensayos de adhesión celular.

Placas de 96 pocillos fueron tapizadas (O/N 4°C) con las diferentes proteínas a las concentraciones indicadas (0.4 µM Y 0.6 µM de GST-PEX9, GST-B1B2, GST-B3B4 para LLC y MEC-1 respectivamente, 120 nM de proMMP-9, 36nM Fn, 18nM VCAM, 0.4 µM ácido hialurónico). Previamente a la adhesión, las células fueron marcadas con 2', 7'-bis (carboxietil)-5 (6')-carboxifluorescein-acetoximetil ester (BCECF-AM) (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) durante 30 minutos a 37°C. Las células se resuspendieron en medio de adhesión (RPMI 1640, 0,5% BSA), a una concentración de 1x10⁶ células/ml y se añadió 100 µl por pocillo en las placas previamente tapizadas y bloqueadas con BSA 0,5 %. Tras una breve centrifugación de 15 segundos para favorecer el decantamiento de las células al fondo del pocillo, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se hicieron varios lavados con medio RPMI 1640 para eliminar las uniones inespecíficas. Posteriormente, las células adheridas se lisaron con 0,1% SDS en PBS. La adhesión se analizó mediante un lector de fluorescencia (PolarStar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania). En algunos casos las células fueron pretratadas antes de poner en la placa con anticuerpos o péptidos indicados en cada figura para testar su posible papel en la inhibición de la adhesión.

Ensayos de migración e invasión *in vitro*

Para establecer las capacidades migratorias de las células se realizaron los siguientes ensayos:

a) Quimiotaxis

5 x 10⁵ células LLC fueron depositadas en la parte superior del filtro de cámaras Transwell de 5 µm de tamaño de poro (Costar, Nueva York, USA). Las células LLC fueron tratadas o no, con diferentes proteínas o anticuerpos en algunos experimentos. Posteriormente los transwell se depositaron en placas de 24 pocillos en los cuales se había añadido previamente 600µl de RPMI sin suero en presencia o no de CXCL12 (100 ng/ml). Tras 24 horas se analizó el porcentaje de migración por citometría de flujo, cuantificando el número de células que habían transpasado los transwell en condiciones constantes de tiempo y velocidad de flujo.

b) Migración transendotelial

Células HUVEC (7,5 x 10⁴ por condición) fueron plaqueadas en la parte superior del filtro de cámaras Transwell previamente tapizados con fibronectina (20 µg/ml). Tras alcanzar la confluencia, las monocapas de HUVEC se incubaron durante 12 horas con TNF-α (15ng/ml) (R&D systems) para inducir la expresión en superficie de VCAM-1 e ICAM-1. A continuación se añadieron 10 x 10⁵ células de LLC preincubadas o no con las proteínas o anticuerpos indicados en cada pie de figura. En compartimentos inferiores se añadió con 600 µl de medio de adhesión en presencia o ausencia de CXCL12 (100 ng/ml) (R&D systems). El nivel de migración celular fue analizado por citometría de flujo de manera similar que en la quimiotaxis. Tras la migración, las células HUVEC fueron teñidas con cristal violeta para excluir cualquier tipo de alteración de la integridad de la monocapa.

c) Invasión a través de matrigel:

Cámaras de Transwell similares a las utilizadas en el ensayo de quimiotaxis fueron tapizadas en la parte superior durante 30 minutos a 37°C con 40µl de matrigel (BD, Biosciences, Erembodegem, Bélgica) diluido previamente 1:3 en RPMI sin suero. En el compartimento inferior se añadieron 600 µl de RPMI sin suero en presencia o ausencia de CXCL12 (100ng/ml). Posteriormente, se añadieron 5 x 10⁵ de células LLC pretratadas o no con las diferentes proteínas o anticuerpos y tras 24 horas se analizó el porcentaje de células que pasaron al pocillo inferior por citometría de flujo.

En algunos casos se quiso estudiar el efecto de péptidos y anticuerpos en la invasión celular, por lo que las células fueron preincubadas durante 30 minutos con las moléculas indicadas en los pies de figura y posteriormente sometidas a los ensayos descritos.

Microscopía confocal

2×10^4 células se adhirieron a cubreobjetos previamente tapizados con poli-Lisina ($10\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 2 horas a 37°C . Tras realizar los tratamientos correspondientes, se lavaron con PBS 1x y fueron fijadas durante 15 minutos con paraformaldehído 1% en PBS 1x (Sigma-Aldrich). A continuación fueron lavadas y bloqueadas con PBS/1% BSA durante 1h. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos primarios ($10\mu\text{g/ml}$), en presencia de gammaglobulinas. Seguidamente, los cubreobjetos se lavaron de nuevo, y se incubaron durante 30 minutos con los correspondientes anticuerpos secundarios (Alexa 488, Alexa 568y/o Alexa 647). Finalmente las muestras fueron lavadas y montadas con Mowiol. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Leica TCS-SP2-AOBS-UV con un objetivo 63x de inmersión de aceite.

El programa Dye-Separation Leica software fue utilizado para analizar el grado de colocación de proteínas. Se generó una gráfica de puntos (dot-plot) donde los ejes X e Y corresponden a la intensidad de fluorescencia de los píxeles de cada canal. La región de colocación se asigna a aquellos píxeles en los que existan altos niveles de intensidad de fluorescencia de ambos canales simultáneamente.

Western blotting

Tras lisar las células a 4°C en solución de lisis (1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 10% glicerol, 1 mM PMSF y $1\mu\text{g/ml}$ de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, Indianapolis, EEUU)), las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida entre el 8-12% en presencia de SDS y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche desnatada en TBS-0,1%Tween durante 1 hora, incubadas durante toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes en solución de bloqueo, y tras ser lavadas (0,1% de Tween 20 en TBS) fueron finalmente incubadas 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca). Las proteínas se visualizaron usando el substrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, Rockford, IL, EEUU). En el caso de cuantificación de las bandas, las imágenes fueron densitometradas en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad Laboratories). En determinados ensayos, las membranas fueron sometidas a un

proceso de *stripping* (3 lavados con buffer 1% Glicina, 1% SDS, 0,0005% NP-40, pH 2,2. a temperatura ambiente para liberar los anticuerpos unidos). A continuación, las membranas fueron bloqueadas e incubadas con distintos anticuerpos para cuantificar la carga total de proteína, siguiendo el mismo método.

Co-Inmunoprecitacion

Para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones las células LLC (10×10^6) fueron lisadas en el buffer 20 mM trietanolamina, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20% glicerol, 10 μ M Na_3VO_4 , 1 μ g/ml de inhibidores de proteasas y un 1% de digitonina (Sigma-Aldrich). Los lisados fueron preaclerados durante 3 horas a 4°C con proteína A o proteína G sefarosa (Amersham Biosciences Europe, Barcelona, Spain), según la especificidad del anticuerpo, para eliminar las uniones inespecíficas, y posteriormente los sobrenadantes incubados con los anticuerpos correspondientes, seguido del acoplamiento específico de dichos anticuerpos a bolas de proteína A o proteína G sefarosa. Las proteínas unidas fueron eluidas en solución de Laemmli, resueltas por SDS-PAGE y analizadas por Western blot.

Zimografía

Para detectar la actividad de la metaloproteínasa (pro)MMP-9 se realizaron ensayos de zimografía. Los sobrenadantes de 2.5×10^6 células cultivadas en medio sin suero sobre distintos sustratos o tratadas con diferentes proteínas, fueron recogidos tras 24 horas, se concentraron 100 veces (columnas Nanosep 3K, Pall Co., Ann Arbor, MI) y se resolvieron en condiciones no reductoras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en presencia de 1% de gelatina (Sigma-Aldrich). Posteriormente, los geles fueron lavados tres veces con 2.5% de Triton X-100 en agua, y se incubaron 16 horas a 37°C en solución de reacción enzimática (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl_2 200mM NaCl). Finalmente, la actividad gelatinocítica de la (pro)MMP-9 fue detectada mediante tinción del gel con una solución de 0,2% Coomassie/Ácido Acético.

Ensayos de supervivencia celular

La viabilidad celular se analizó a través del marcaje de fosfatidilserinas, las cuales se exponen hacia el exterior en la membrana plasmática cuando las células entran en apoptosis, utilizando el kit de Anexina V-FITC (Immunostep). Las células fueron resuspendidas en solución de unión (128 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgSO_4 , 1,2 mM CaCl_2 y 50 mM HEPES en H_2O), marcadas con Anexina-FITC durante 10 minutos en oscuridad y con yoduro de propidio (Sigma Aldrich) y analizadas mediante citometría de flujo.

Silenciamiento de proteínas por siRNA

Se diseñaron siRNA de doble cadena (Ambion, Austin, TX) correspondientes a secuencias de las proteínas indicadas en la tabla. Antes de su utilización se verificó que todas las secuencias de siRNA utilizadas fueran específicas de sus dianas mediante búsqueda en las bases de datos NCBI Blast (frente al genoma humano). En la Tabla 8 se muestran las secuencias de la hebra sentido de cada uno de los siRNAs utilizados. Para la transfección, en primer lugar se preincubaron durante 10 minutos 2 µg de siRNA y 4,5µl del reactivo de transfección HiPerfect ((Qiagen, Hilden, Germany) en 100µl de RPMI sin suero. Posteriormente, se añadió esta mezcla a las células LLC en RPMI con suero gota a gota. Las células transfectadas fueron usadas a 16 horas en el caso de siRNA de β 1, tras 24 horas para el siRNA de CD44 y STAT1. La viabilidad de las células transfectadas fue analizado por annexina V y yoduro de propidio mediante citometría de flujo.

siRNA	Secuencia
Subunidad β 1 siRNA	GGAAUGUCCUAUUUUAACdTT
CD44 siRNA	GAACGAAUCCUGAAGACAUCdTT
STAT1 1	CGGUUGAACCCUACACGAATT
Control siRNA	AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTT

Tabla 8. Secuencias de los siRNAs utilizados en este trabajo.

Vectores de expresión y purificación de proteínas de fusión a GST.

El vector de expresión que codifica para la proteína proMMP-9 fue donado por el Dr. Santos Mañes (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España). El DNA de las diferentes proteínas de fusión generadas fue amplificado mediante PCR y subclonado entre las dianas de las enzimas de restricción Eco-R1 y Xho-I en el vector pGEX4T3 (GE Healthcare, Palo Alto, CA, EEUU) codificante para GST (Figura 12). En la siguiente Tabla 9 aparecen los oligos utilizados para generar todas las construcciones. Los oligos se diseñaron en Sigma-Aldrich.

OLIGO	5'-----3'	Construcción
PEX9 F	GAATTCCTTTGAGTCCGGTGGACG	PEX9
PEX9 R	CTCGAGCTAGTCCTCAGGGCACTGCA	PEX9
D1D2 F	GAATTCCTTTGAGTCCGGTGGACG	D1D2
D1D2 R	CTCGAGTCACCTGGGCCACGTC	D1D2
D3D4 F	GAATTCAGCCGACGTGGCCCAG	D3D4
D3D4 R	CTCGAGCTAGTCCTCAGGGCACTGCA	D3D4
D1 F	GAATTCCTTTGAGTCCGGTGGACG	D1
D1 R	CTCGAGTCCAGCTTGCGGGGCA	D1
D2 F	GAATTCACCGCTGGACTCGGTCTTTG	D2

D2 R	CTCGAGTCACCTGGGCCACGTC	D2
D3 F	GAATTCAGCCGACGTGGCCAG	D3
D3 R	CTCGAGTCCAAAGGCACCCCGG	D3
D4 F	GAATTCTTTGGACACGCACGACG	D4
D4 R	CTCGAGCTAGTCTCAGGGCACTGCA	D4

Tabla 9. Oligos (Sigma Aldrich) para generar las diferentes proteínas de fusión con GST

Las proteínas GST y de fusión con GST generadas, fueron expresadas en bacterias termocompetentes DH5α *Escherichia coli*, tras su inducción con isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside, fueron lisadas en buffer 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris, 50 mM Na₂EDTA, 10% Tritón por sonicación. Tras la lisis, se centrifugó y dependiendo de las proteínas recombinantes estas fueron detectadas en el medio soluble o en el pellet formando cuerpos de inclusión. Las proteínas encontradas en el sobrenadante fueron GST, GST-D1, GST-D2 y GST-D3 y fueron purificadas con una columna de Glutación agarosa (Sigma Aldrich). El resto de las construcciones (GST-PEX9, GST-D4, GST-ΔD1, GST-ΔD2, GST-ΔD3 y GST-ΔD4) fueron solubilizadas en una solución 1x PBS, 1% sarkosyl. Una vez solubles estas proteínas no eran capaces de unirse a la columna de glutación agarosa debido al gran porcentaje de detergente en el medio, de manera que se purificaron por electroelución SDS-PAGE y posteriormente se dializaron frente a PBS 1x. . La pureza de las proteínas de fusión se analizó en geles de acrilamida con azul de coomasie y por *western-blot*.

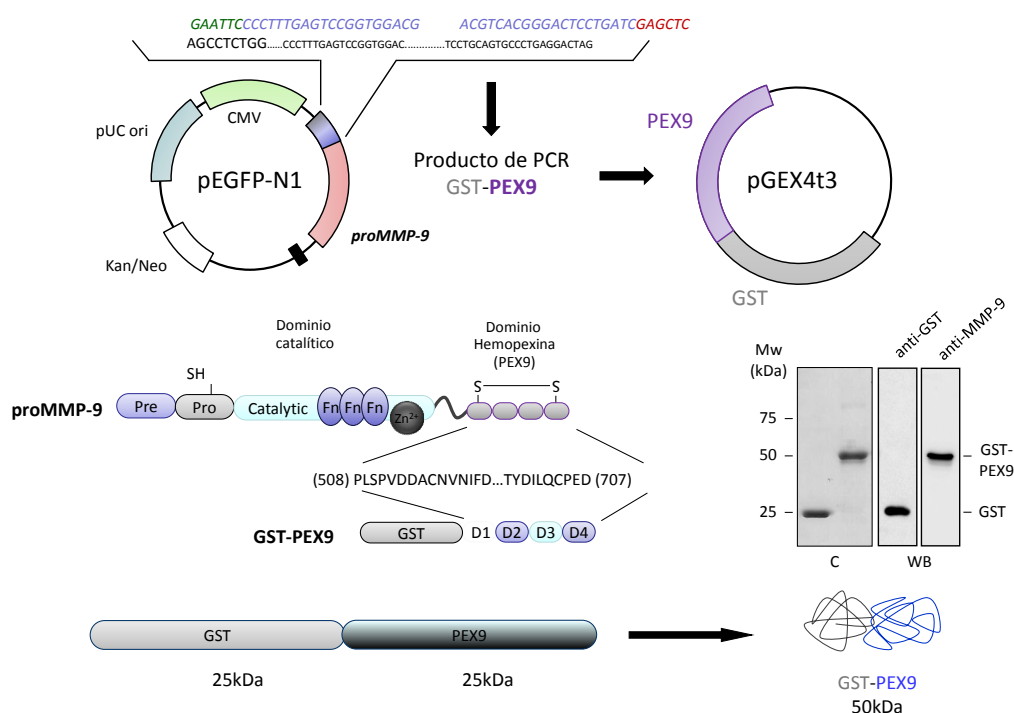


Figura 12: Esquema del procedimiento seguido para generar la proteína de fusión GST-PEX9.

Preparación del anticuerpo policlonal anti-P3.

En primer lugar se preparó el inmunógeno. Para ello se acopló la proteína portadora “keyhole Limpet Hemocianina” (KLH) (Calbiochem) a el sulfo-succinimidyl-4-(N-malenidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)” en una proporción molar de 1:6000 1 hora a 30°C. A continuación, se eliminó el exceso de reactivo por filtración en gel en una columna PD10. Una vez acoplado y dializado se mezcló con el péptido P3 en una proporción de 1:3000 en un tampón de 0,1M fosfato a pH 7,6 durante toda la noche a 4°C en oscuridad y se dializó frente a PBS. Para la obtención del anticuerpo se inmunizó un conejo New Zealand con 250µg de P3-KLH en adyuvante Freud’s por inyecciones subcutáneas en diferentes zonas. Se continuó con el protocolo de inmunización inyectando 125µg del antígeno durante 3 semanas. El siguiente paso fue testar la presencia de anticuerpos frente a este péptido. Se extrajo la sangre, se recogió el suero y se purificó el anticuerpo anti-P3 en una columna de Sefarosa-A (GE Healthcare). La especificidad del anticuerpo se analizó por medio de la técnica Elisa, inmovilizando los péptidos a una concentración de 8 µM o las proteínas a 2 µM usando el suero pre-inmune IgG como control.

Análisis mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Los estudios de expresión génica se iniciaron con la evaluación del tipo y cantidad de los ARN mensajeros (ARNm) específicos para cada proteína. Para ello se realizó la extracción del ARN total, se extrajo el RNA de 10×10^6 células con Trizol y se siguió el protocolo de la casa comercial. Para la obtención del cDNA se utilizó la enzima m-MULV (Fermentas). Después se amplificó el cDNA con la Taq polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando los primers y las condiciones de PCR resumidas en la tabla 10 y 11. Como control de carga y de expresión se utilizó GAPDH.

10 min 95°C			Desnaturalización Inicial
21 ciclos	1min	95°C	Desnaturalización
	1min	60°C	Anillamiento
	2min	72°C	Extensión
10 min 72°C			Extensión Final

Tabla 10. Condiciones de las PCRs realizadas en este trabajo.

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa del 1-1.8 % (p/v), con Bromuro de etidio. Como control de carga, se desarrolló para cada muestra la RT-PCR para la GAPDH, usando los oligonucleótidos correspondientes.

Las PCR cuantitativa se llevaron a cabo con iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y con los primers indicados en la Tabla 11, se realizaron triplicados de cada condición se utilizó el Termociclador Lightcycler 480 (Roche), como control para normalizar los datos se utilizó la expresión de la proteína TBP y se analizaron los datos obtenidos con el Software reléase 1.5.0. de Roche usando el método $\Delta\Delta CT$ para cuantificar.

Nombre	Oligos 5'-3'
MMP-9 F	TGGGCTACGTGACCTATGAC
MMP-9 R	CAAAGGTGAGAAGAGAGGGC
CD19 F	TCTTCAACGTCTCTCAACAG
CD19 R	AGGTGGAATGACATGGTCA
GAPDH F	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTC
GAPDH R	CGGCCATCACGCCACAGTTTC
PCR cuantitativa	Oligos 5'-3'
MMP-9 F	GAACCAATCTCACCACAGG
MMP-9 R	GCCACCCGAGTGTAACCATA
VEGF F	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG
VEGF R	GGTCCCAGAAACCCTGAG
TBP	CGGCTGTTAACTTCGCTTC
TBP	CACACGCCAAGAAACAGTGA

Tabla 11. Secuencia de los oligos utilizados para llevar a cabo PCRs en este trabajo.

Ensayos de invasión homing y migración *in vivo*.

Para analizar la capacidad de inhibición de la invasión y migración de células LLC *in vivo* se inyectaron de forma intravenosa 10×10^6 células en la cola de ratones inmunodeprimidos NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Tras 24 horas, se les extrajo el bazo, y la medula ósea y se disgregaron los tejidos. La presencia de células en los distintos órganos se analizó por expresión de CD19 humano mediante extracción de RNA y posterior RT y PCR, se utilizó como control GAPDH de ratón. Algunos ratones fueron inyectados con células LLC previamente incubadas con distintas proteínas.

En otros ensayos similares se inyectaron células LLC marcadas previamente con el colorante vital CFSE (Invitrogen). Transcurridas 3 horas se sacrificaron los animales y se extrajeron la medula ósea, el bazo y la sangre periférica. Los órganos se disgregaron, se analizó la presencia de células mediante citómetro.

Análisis de la afinidad de unión soluble de los péptidos a las células LLC.

1 x 10⁶ células MEC-1 fueron preincubadas a temperatura ambiente simultáneamente con 1 µM de los péptidos fluoresceinados y con concentraciones crecientes de los mismos péptidos sin marcar en un volumen final de 100µl. Tras 60 minutos fueron centrifugadas y se recogió el sobrenadante en el que se encontraba el péptido no unido, para analizar la fluorescencia en un lector de placas. La cantidad de péptido unido se calculó al substrair al input la cantidad de péptido libre que se encontraba en cada sobrenadante. Los análisis de la unión se realizaron usando la función empírica de Hill:

$$B = B_{max} \frac{(F/F_{50})^n}{1 + (F/F_{50})^n}$$

B es la concentración del péptido unido a la célula, B_{max} es la máxima capacidad de unión, F es la concentración de péptido libre, F₅₀ es B_{max}/2 y n es el coeficiente de Hill. Estos análisis permiten la estimación de un valor de K_D y la comparación de las propiedades de unión de los diferentes péptidos. Para este análisis se utilizó el programa MATLAB.

Fraccionamiento núcleo citoplasma

10 x 10⁶ células, preincubadas o no con las proteínas indicadas en los pies de figura, se resuspendieron en 400µl del buffer de fraccionamiento A (10mM HEPES pH7,6, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,75mM Spermidine, 0,75mM Spermine, 1mMDTT) con los inhibidores de proteasas, tras 15 minutos en hielo se añadió 10% Nonidet-P40, se mezcló con intensidad y se centrifugó obteniéndose en el sobrenadante la fracción citosólica. En el pellet se encontraba la fracción del núcleo la cual fue lisada durante 20 minutos a 4°C con 50 µl del buffer B (20mM HEPES pH 7,6, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, con los inhibidores de proteasas). Tras esta incubación se centrifugó para eliminar el material insoluble. Se realizó una BCA para determinar la concentración de proteína en cada fracción. Se analizó por western blot la misma cantidad de proteína de cada fracción. Como control de la fracción nuclear se utilizó el Histona 4.

Ensayos de xenotransplante e inhibición del crecimiento tumoral

10 x 10⁶ células MEC-1 fueron inyectadas de forma subcutánea en ratones NOD/SCID de 6-8 semanas, transcurridos 15-20 días se empezaron a detectar tumores. A partir de este momento se comenzó el tratamiento que consistió en inyectar 3 días por semana 1 mg/kg/día (20 µg/ratón) de GST-PEX9 o 5 µg/ratón de anti-P3. Cuando los ratones control presentaron

tumores de un tamaño aproximado de 500mm³ los animales fueron sacrificados, se extrajo el tumor y se analizó su tamaño (volumen y peso).

Ensayo de formación de tubos con células HUVEC

En primer lugar se tapizaron pocillos de placas de 48 con 100 µl de matrigel y se incubaron 30 minutos a 37°C, a continuación se añadieron 25 x 10⁵ células HUVEC previamente incubadas sin suero durante 2 horas. El siguiente paso fue añadir los diferentes tratamientos: PEX9 (0.4 µM), proMMP-9 (120 nM), LLC (1 x10⁵ células) o el mismo número de células de LLC preincubadas con las proteínas PEX9 y proMMP9. Se dejaron las placas en el incubador durante 6 horas y se tomaron fotografías con el microscopio (Nikon eclipse TE300).

Análisis estadístico

La prueba T de Student fue utilizada para analizar las diferencias estadísticamente significativas entre medias de pares de datos. Para tres o más condiciones, los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un análisis de comparación múltiple de Tukey-Kramer. En ambos tipos de análisis el nivel de significación fue $p < 0,05$. Las diferencias significativas fueron representadas como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$.

Resultados

LA proMMP-9 SE UNE A CÉLULAS LLC A TRAVÉS DE LA INTEGRINA A4B1 Y DE CD44 INHIBIENDO LA MIGRACIÓN CELULAR Y LA APOPTOSIS.

La proMMP-9 es capaz de unirse a la superficie de las células LLC a través del complejo formado por la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v.

Resultados anteriores del laboratorio, han demostrado que aunque la proMMP-9 es secretada principalmente al medio por las células LLC, también es capaz de unirse a su membrana celular. Así tras la administración de proMMP-9 exógena a células LLC se detectó (pro)MMP-9 en membrana por citometría de flujo (Figura 13)[177]

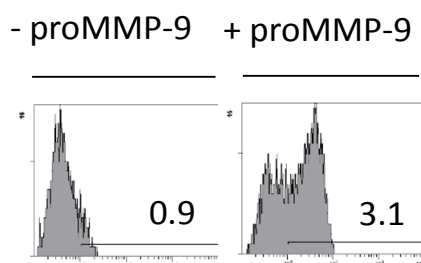


Figura 13. La proMMP-9 se une a la superficie celular de LLC: Células LLC fueron incubadas con proMMP-9 (110 nM), tras 30 minutos se lavaron y se analizó la unión de proMMP-9 a la superficie celular por citometría de flujo con la utilización de un anticuerpo específico anti-MMP-9

A continuación, nos propusimos estudiar los receptores a los que se unía la (pro)MMP-9 en la membrana, y para ello, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación de la (pro)MMP-9. Estos ensayos mostraron una asociación directa de la (pro)MMP-9 con la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44, en concreto con una forma variante de esta proteína de mayor tamaño (190kDa) que la forma estándar CD44H (85/95kDa) (Figura 14A) [177].

También se realizaron análisis de inmunofluorescencia para confirmar la colocalización de la (pro)MMP-9 con la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v. El análisis de las imágenes de microscopia confocal reveló que, en efecto, existe una colocalización de la (pro)MMP-9 con las dos proteínas de membrana, que actúan por tanto como un complejo de unión (Figura 14B).

Para confirmar los resultados anteriores, se realizaron ensayos de adhesión sobre proMMP-9 pretratando las células con diferentes agentes bloqueantes de los receptores $\alpha 4\beta 1$ y CD44, como anticuerpos específicos (HP2/1, HP1/7, HP2/9), péptidos (CS1, CS3) o siRNAs específicos. Los resultados obtenidos muestran una disminución de la adhesión a proMMP-9 cuando las células fueron tratadas previamente con los inhibidores de la integrina, el péptido CS1 y el anticuerpo HP2/1 y con el anticuerpo inhibidor del CD44 (HP2/9). No sucedió lo mismo con el anticuerpo HP1/7 o el péptido control CS3. Esta disminución también existía en

aquellas células en las que se silenció la integrina $\alpha 4\beta 1$ y el CD44 por medio de siRNAs (Figura 14C).

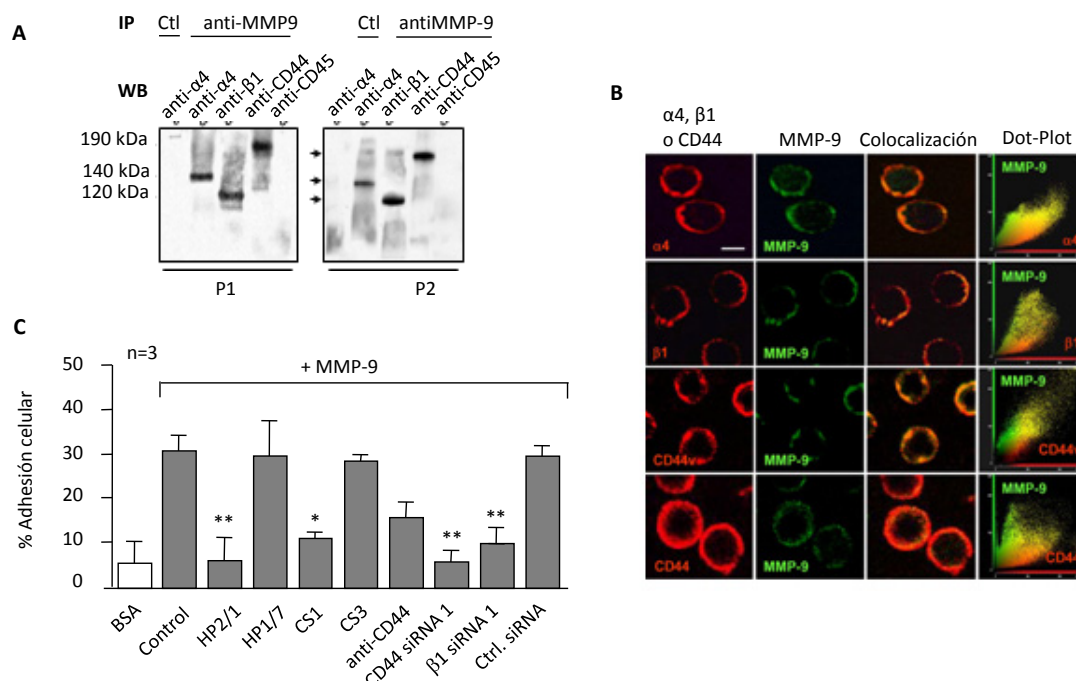


Figura 14. La (pro)MMP-9 se une a la membrana celular a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y el CD44v: (A) Lisados de células LLC fueron inmunoprecipitados con anticuerpos control o anti-MMP-9. El Western blot fue realizado con anticuerpos anti- $\alpha 4$, anti- $\beta 1$, anti-CD44 y anti-CD45 (anticuerpo control negativo). (B) Análisis mediante microscopía confocal de la colocalización de proMMP-9 con la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v. (C) Células LLC transfectadas con siRNA control o con siRNA de $\beta 1$ o CD44 o preincubadas o no con las moléculas indicadas, fueron sometidas a ensayos de adhesión sobre proMMP-9 (110nM) (1hora, 37°C). (*p<0,05; **p< 0,01).

La unión de proMMP-9 a la membrana celular de células LLC requiere la presencia del dominio hemopexina PEX9 y da lugar a una inhibición de la migración transendotelial y de apoptosis.

Una vez determinados los receptores celulares a los que se une la proMMP-9 se analizaron los dominios estructurales de la proMMP-9 implicados en esta unión. Para ello utilizamos las proteínas recombinantes donadas por el Dr. Ghislain Opdenakker (Leuven, Bélgica) que contienen la proMMP-9 completa (rproMMP-9) o deleciones en el dominio hemopexina (Δ PEX9) o PEX9 más el dominio O-glucosídico (Δ PEX9OG). Utilizamos también una proteína con una mutación en el glutámico 402 a alanina, que bloquea la actividad catalítica (Figura 15A). Se analizó la capacidad de unión de las células LLC a estas proteínas y como se observa en la Figura 15B, las células LLC fueron incapaces de unirse cuando no estaba presente el dominio PEX9, mientras que sí se unen a la proteína mutante inactiva al mismo nivel que a la proMMP-9 completa. Estos datos sugirieron que el dominio PEX9 es esencial para la unión de la proMMP-9 a la membrana y que la actividad catalítica de la MMP-9 no parece ser necesaria para esta unión.

§

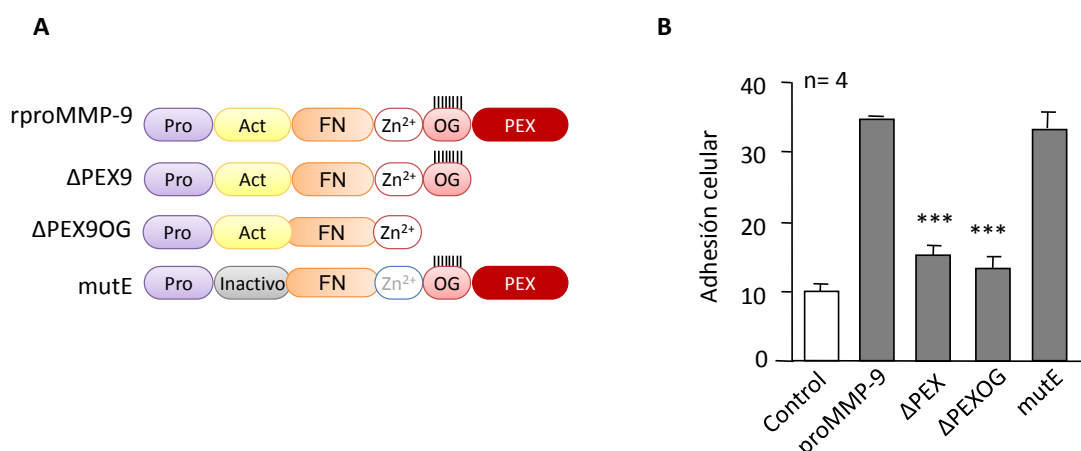


Figura 15. La proMMP-9 se une a las células de LLC a través de su dominio hemopexina: (A) Esquema de las proteínas recombinantes modificadas de la proMMP-9. (B) Análisis de la adhesión de células LLC a las proteínas mostradas en (A). (***) $p < 0,001$.

Una vez establecido que (pro)MMP-9 es capaz de unirse a células de LLC a través de $\alpha 4\beta 1$ y CD44v estudiamos las posibles consecuencias funcionales de esta unión. Como se observa en la Figura 16A, la incubación de las células LLC con proMMP-9 (60nM-110nM) inhibía la migración celular en respuesta a CXCL12. Este efecto era específico y mediado a través de los receptores de (pro)MMP-9 mencionados, ya que el silenciamiento de estos con siRNAs específicos revertían el efecto inhibitorio de la proMMP-9, y esto no se observaba en las células transfectadas con el siRNA control. Los mismos resultados se consiguieron al preincubar las células con anticuerpos inhibidores de los receptores de proMMP-9 como anti-CD44 y anti- $\alpha 4$ y no con el anticuerpo control Figura 16A.

Además, se confirmó la importancia del dominio PEX9 en esta inhibición, realizando experimentos de migración transendotelial con células previamente incubadas con las proteínas recombinantes Δ PEX9 y Δ OGPEX9. Como muestra la Figura 16B, estas proteínas no inhibían la migración de células LLC, mientras que la proMMP-9 completa sí lo hacía. Estos resultados confirmaron la importancia del dominio PEX9 en la unión de la proMMP-9 a células LLC y por lo tanto a las posteriores funciones (Figura 16).

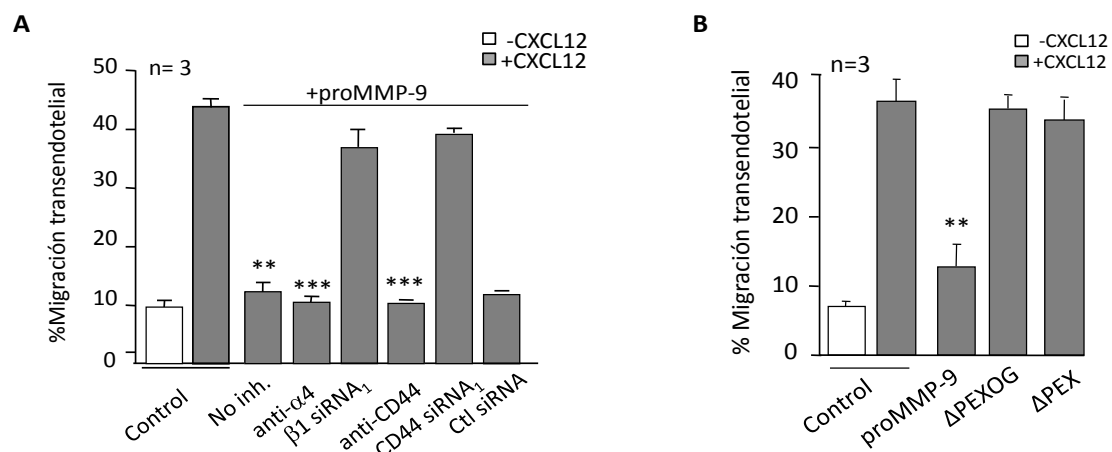


Figura 16: El bloqueo de la unión de proMMP-9 a la integrina $\alpha 4\beta 1$ y a CD44v o la ausencia del dominio hemopexina, inhiben la acción de la proMMP-9 en migración: (A) Células LLC fueron transfectadas o no con siRNAs control o siRNAs $\beta 1$, o CD44, o pretratadas con inhibidores de la subunidad $\alpha 4$ o de CD44 y se analizó su migración transendotelial a través de células HUVEC. (B) Ensayo de migración transendotelial con células LLC incubadas con las proteínas indicadas (110nM). (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Como se ha mencionado en la introducción, el ambiente celular en el que se encuentran las células LLC *in vivo* es esencial para su supervivencia. La (pro)MMP-9 es una de las proteínas que se encuentran en este microambiente, y por ello nos interesó analizar lo que ocurría al cultivar las células LLC sobre proMMP-9 *in vitro*. Como se muestra en la Figura 17A se observó una disminución de la apoptosis espontánea en las células incubadas sobre proMMP-9, que se revertía al inhibir los receptores celulares $\alpha 4\beta 1$ y CD44. También analizamos el papel del PEX9 en esta función, observando que cuando se cultivaban las células sobre las proteínas recombinantes con delección en este dominio no se observaba la protección frente a apoptosis (Figura 17B). Sin embargo el mutante catalíticamente inactivo MutE, sí producía esta protección corroborando los datos anteriores que sugerían un importante papel de PEX9 y no de la actividad catalítica en este efecto.

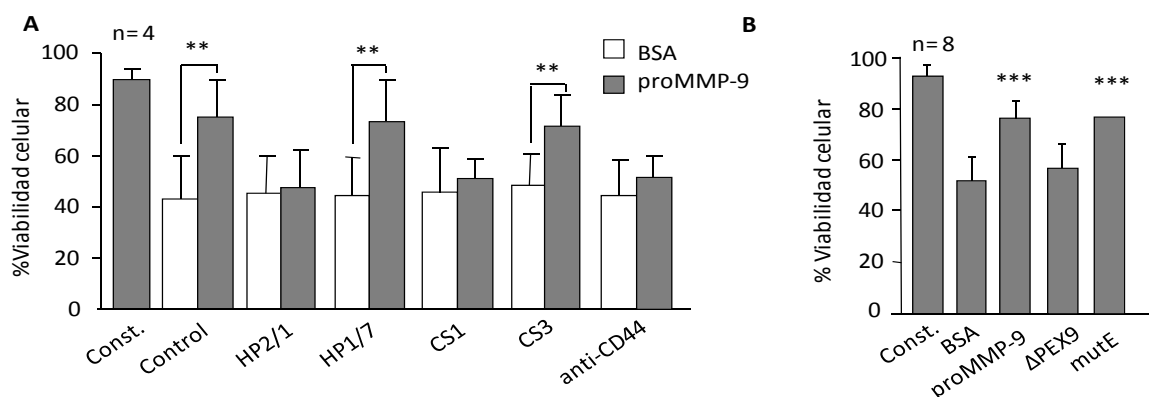


Figura 17. La proMMP-9 previene la apoptosis espontánea de células LLC: (A) Células LLC preincubadas o no, con los inhibidores indicados, se cultivaron en placas de 96 pocillos tapizados o no con proMMP-9 (110nM). Tras 48 horas se analizó la viabilidad celular por medio de anexina V y yoduro de propidio. (B) Células LLC fueron incubadas en placas de 96 pocillos tapizados o no con las proteínas recombinantes indicadas (110nM). Tras 48 horas se analizó su viabilidad celular. El aumento de la supervivencia de las células sobre proMMP-9 fue significativo ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Además, se analizó la ruta de señalización que daba lugar a inducción de supervivencia y se demostró, que se producía una primera fosforilación de la quinasa Lyn y una subsiguiente fosforilación del factor de transcripción STAT-3 el cual se translocaba al núcleo para inducir la transcripción de la proteínas anti-apoptótica Mcl-1 (Figura 18)[162].

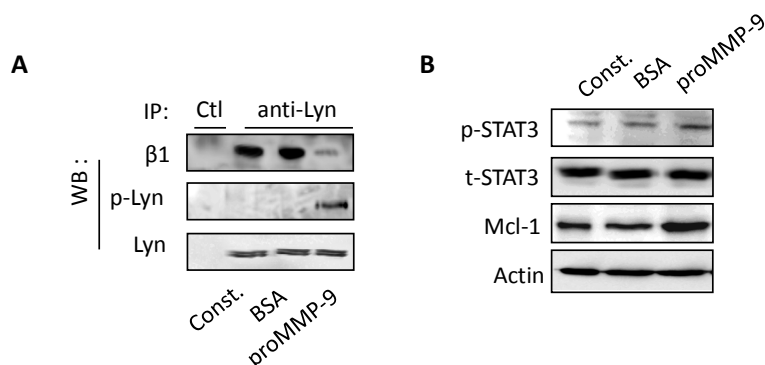


Figura 18. La proMMP-9 induce la fosforilación de Lyn y de STAT3 y un aumento en la expresión de Mcl-1 induciendo supervivencia celular: (A) Células de LLC fueron tratadas con proMMP-9 y tras 30 minutos se lisaron, se inmunoprecipitó Lyn y se analizó la expresión de Lyn total y p-Lyn con anticuerpos específicos. (B) Células LLC se trataron con proMMP-9 y tras 1 hora (STAT3) y 24 horas (Mcl-1) se analizaron las proteínas indicadas con los anticuerpos específicos.

Con todos estos datos podemos concluir que la unión de proMMP-9 a la membrana de las células LLC requiere el dominio PEX9 y que esta unión inhibe la migración e induce supervivencia contribuyendo así a la patogénesis de la enfermedad (Figura 19)

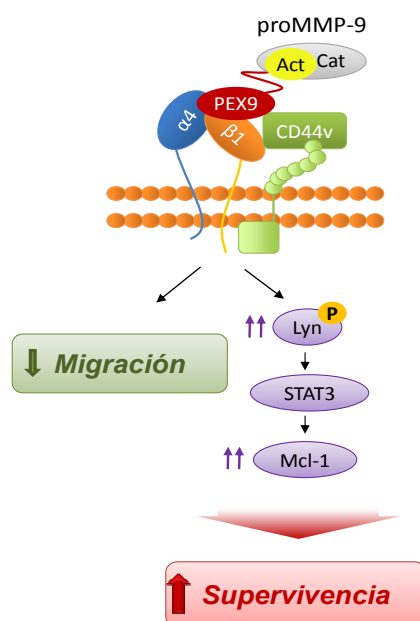


Figura 19. Esquema que resume la unión de la proMMP-9 a la membrana de LLC y sus consecuencia funcionales.

EL DOMINIO PEX9 DE PROMMP-9 SE UNE A CÉLULAS LLC A TRAVÉS DE LA INTEGRINA $\alpha 4 \beta 1$ Y REPRODUCE LAS FUNCIONES INDUCIDAS POR PROMMP-9 EN ESTAS CÉLULAS.

El dominio PEX9 se une a células primarias LLC y a la línea celular MEC-1 de manera dosis dependiente a través de la integrina $\alpha 4 \beta 1$.

Tras comprobar que la proteína proMMP9 Δ PEX9 no era capaz de unirse a las células LLC, quisimos estudiar qué sucedía con el PEX9 aislado. Para ello se preparó una proteína de fusión GST-PEX9 (Figura 20A). Tras su purificación, se comprobó su pureza con geles de poliácridamida teñidos con azul Coomassie y por *Wester blot* (Figura 20B).

En primer lugar, se analizó la capacidad de unión de GST-PEX9 a células LLC primarias y a la línea celular MEC-1. Para ello, se tapizaron pocillos de placas de 96 con diferentes concentraciones de GST-PEX9 y de GST como control. Como se observa en la Figura 19C, las células se adherían a GST-PEX9 de manera dosis dependiente, pero no a GST, indicando que la adhesión observada era específicamente mediada por PEX9 (Figura 20C).

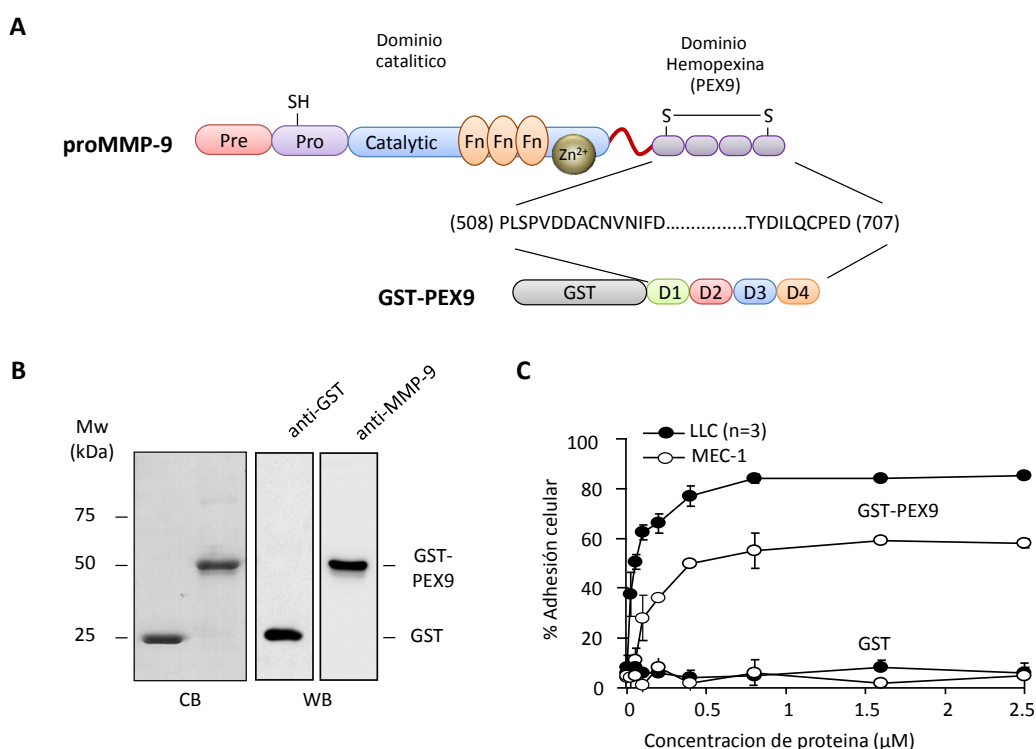


Figura 20. El dominio PEX9 se une de forma dosis dependiente a células LLC: (A) Representación esquemática de los dominios de proMMP-9 y de los subdominios de PEX9 (D1-D4) y descripción grafica de como se clonó el GST-PEX9. (B) Comprobación de la pureza del GST-PEX9 sintetizado por medio de geles de poliácridamida teñidos con azul de Coomassie y por Western-blot revelados con un anticuerpo anti-MMP-9 o anti-GST. (C) Adhesión de células de LLC y MEC-1 sobre concentraciones crecientes de GST-PEX9 y GST. Tras 1 hora, se analizó el porcentaje de celulas adheridas en cada pocillo.

Para determinar si la unión celular a GST-PEX9 era mediada por los mismos receptores descritos para proMMP-9 se preincubaron las células con diferentes inhibidores de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (el anticuerpo HP2/1 y el péptido CS1), de CD44 (el anticuerpo HP2/9) o con anticuerpos o péptidos control. Los resultados mostraron una fuerte inhibición de la adhesión en células tratadas con los inhibidores de la integrina pero no con el anticuerpo anti-CD44. Se corroboró el buen funcionamiento del anticuerpo HP2/9 testando la adhesión celular a ácido hialurónico,

principal ligando de CD44 (Figura 21).

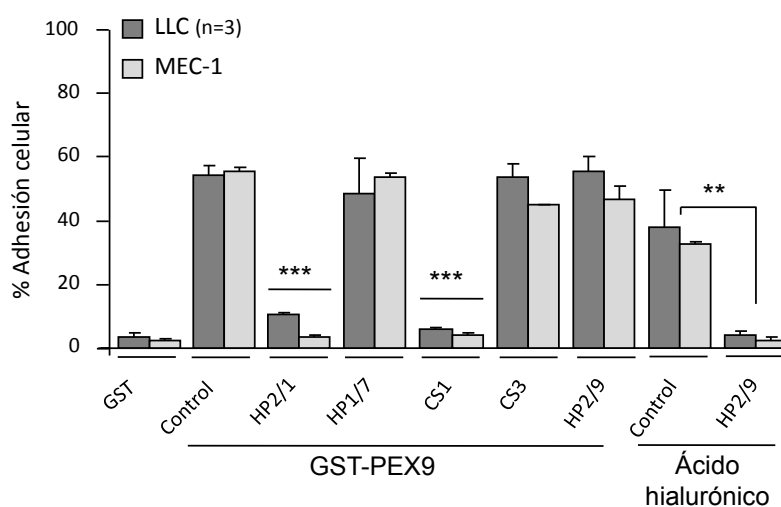


Figura 21. La unión de células MEC-1 y LLC primarias a GST-PEX9 se produce a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$: Células MEC-1 y de LLC pretratadas con los inhibidores indicados fueron usadas en ensayos de adhesión sobre GST-PEX9 (0.2 μ M para LLC y 0.4 μ M para MEC-1) o ácido hialurónico (0.4 μ M). El bloqueo de la adhesión a GST-PEX9 producida por los inhibidores

de la integrina fue significativo (***) $p < 0,001$), así como la inhibición del anti-CD44 en la adhesión a ácido hialurónico (** $p < 0,01$).

Para confirmar la importancia de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la unión a GST-PEX9, se utilizaron células K562, tanto la línea parental, que expresa $\alpha 5\beta 1$ pero no $\alpha 4\beta 1$, como células transfectadas con la subunidad $\alpha 4$ (K562- $\alpha 4$). La expresión de estas proteínas fue verificada por citometría de flujo (Figura 22A). Se observó que las células K562 eran incapaces de unir GST-PEX9 mientras que sí se unían a fibronectina (FN), conocido ligando de $\alpha 5\beta 1$, esta unión era bloqueada con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ (P1D6) (Figura 22B). En cambio las células K562- $\alpha 4$ se adherían a la proteína GST-PEX9 y esta unión era inhibida por el anticuerpo HP2/1, pero no por el anticuerpo control HP1/7 (Figura 22B).

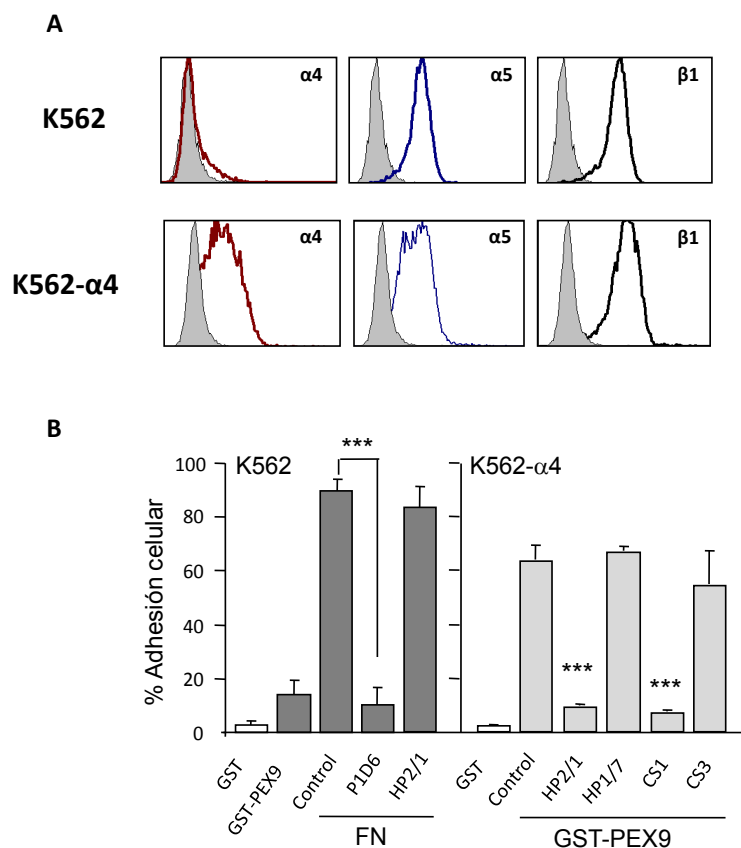


Figura 22. El dominio PEX9 se une a las células K562-α4 pero no a la línea parental K562: (A) Análisis de la expresión de las subunidades de las integrinas α4, α5 y β1 por citometría de flujo en las líneas celulares K562 y K562-α4. (B) Estas líneas celulares previamente preincubadas o no con los inhibidores indicados, fueron sometidas a ensayos de adhesión sobre GST (0.2 μM), GST-PEX9 (0.4 μM) y FN (0.036 μM). Tras 1 hora se cuantificó el porcentaje de células adheridas (***) (***)p<0,001).

Tras el estudio de la adhesión a GST-PEX9, se analizó unión de GST-PEX9 soluble a las células LLC. Se observó que GST-PEX9 en forma soluble se unía también a las células y que la unión era bloqueada por inhibidores de la integrina α4β1. Como control negativo se utilizó la proteína GST comprobándose la especificidad del dominio PEX9 (Figura 23).

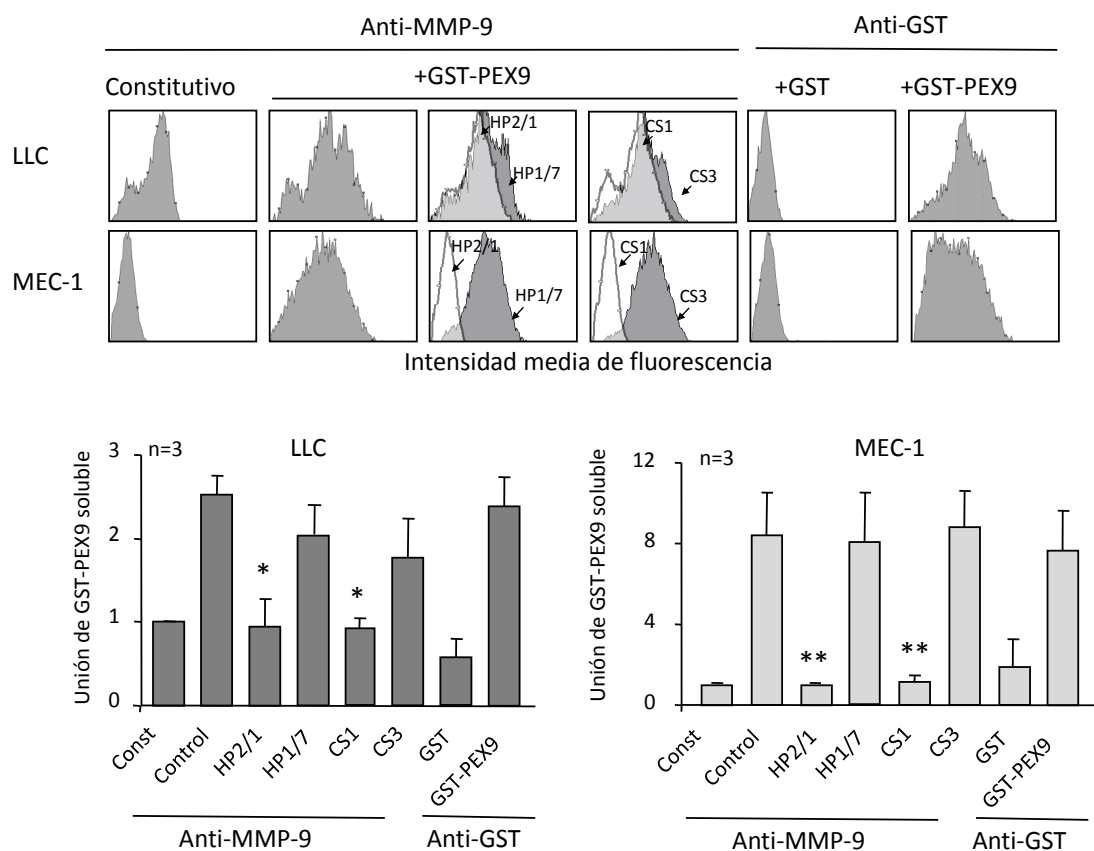


Figura 23. GST-PEX9 en forma soluble se une a células primarias LLC y MEC-1: Células de pacientes de LLC y de la línea celular MEC-1 tratadas o no previamente con inhibidores de la integrina $\alpha 4\beta 1$, fueron incubadas 30 min con GST-PEX9 o GST (0.4 μ M para LLC y 0.6 μ M para MEC-1). Se detectó la unión de PEX9 mediante citometría de flujo por la incubación con anticuerpos anti-MMP-9 o anti-GST. (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$).

Para corroborar los datos obtenidos, células LLC fueron transfectadas con siRNAs para la subunidad $\beta 1$ de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y de CD44. Tras comprobar el silenciamiento de estas proteínas por *Western blot* (Figura 24 A) y por citometría de flujo (Figura 24 B), se realizaron ensayos de adhesión a GST-PEX9. Los datos obtenidos mostraron que el silenciamiento de la subunidad $\beta 1$ inhibía significativamente la adhesión a GST-PEX9, mientras que el silenciamiento de CD44 tenía un efecto mucho menor (Figura 24C).

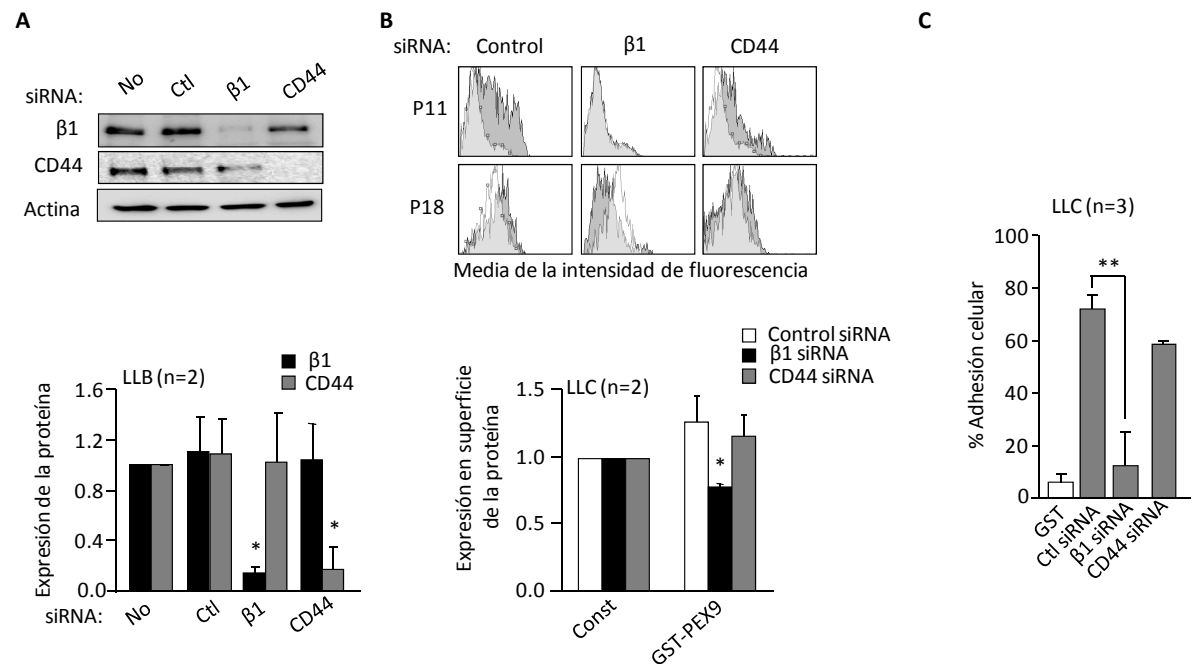


Figura 24. Efecto del silenciamiento de la subunidad $\beta 1$ y de CD44 en la adhesión células LLC a GST-PEX9: Células de LLC fueron transfectadas con los siRNAs de CD44 y $\beta 1$. El silenciamiento se comprobó por Western blot (A) y por citometría de flujo. (C) Análisis de la adhesión a GST-PEX9 de células LLC transfectadas con siRNA para $\beta 1$ o siRNA para CD44. La adhesión fue significativamente inhibida en ausencia de $\beta 1$ (** $p < 0,01$).

Se analizó también la unión de GST-PEX9 a células MEC-1 mediante microscopía confocal. Las imágenes de la Figura 25 muestran que la señal de GST-PEX9 colocaliza con la expresión tanto de la subunidad $\alpha 4$ como $\beta 1$. Esta colocalización corrobora los datos obtenidos en los ensayos de adhesión y unión soluble, destacando el papel de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la unión de GST-PEX9 a las células LLC.

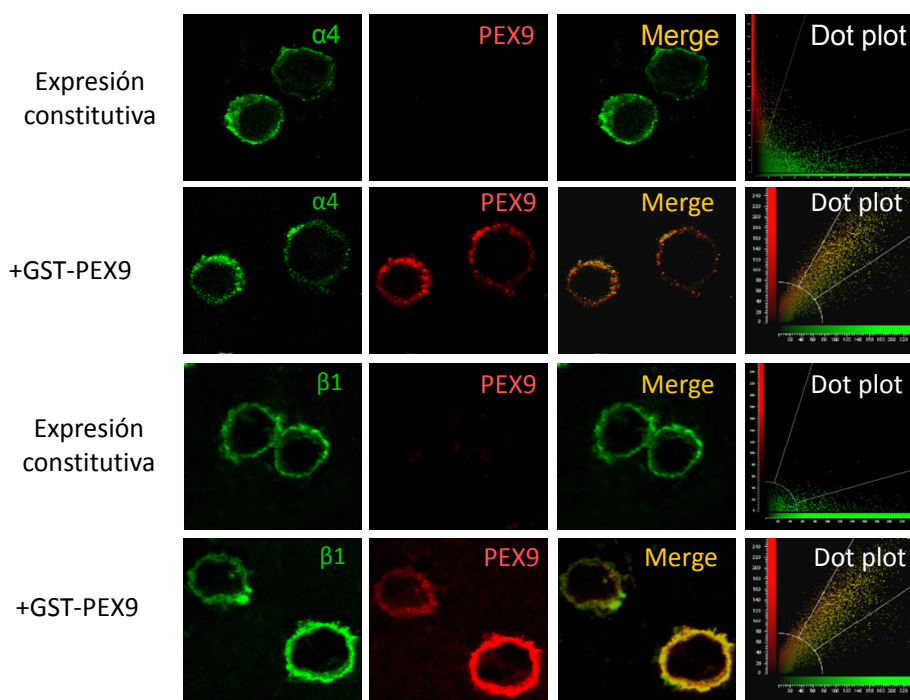


Figura 25. GST-PEX9 colocaliza con la integrina $\alpha 4\beta 1$ en células MEC-1: MEC-1 incubadas o no con $0.6 \mu\text{M}$ GST-PEX9, durante 30 minutos, fueron analizadas por microscopía confocal para detectar la posible colocalización de GST-PEX9 con las subunidades de la integrina $\alpha 4\beta$. Utilizando los anticuerpos primarios correspondientes para cada proteína (anti-MMP9, anti- $\alpha 4$, anti- $\beta 1$ o anti-CD44)

La unión del dominio PEX9 a las células de LLC provoca una inhibición de la migración celular *in vitro* e *in vivo*.

Una vez analizada la adhesión de GST-PEX9 a las células de LLC nos dispusimos a determinar su posible papel en migración celular, ya que este proceso es muy importante en la progresión de la enfermedad. Se realizaron experimentos de quimiotaxis (A), migración transendotelial a través de células HUVEC (B) y , ensayos de migración con Matrigel (C) en respuesta a quimioquina CXCL12. En todos los casos, cuando las células eran pretratadas con la proteína GST-PEX9 la migración disminuía (Figura 26).

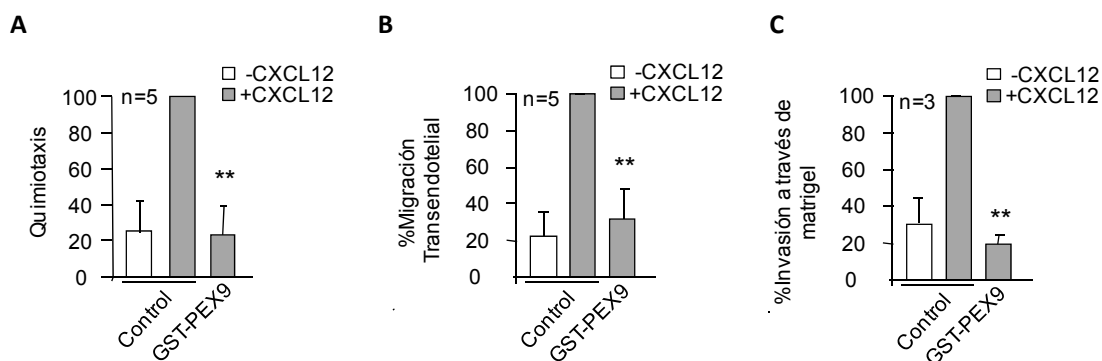


Figura 26. Migración de células LLC tratadas con GST-PEX9 *in vitro*: Células de pacientes de LLC incubadas con $0.4 \mu\text{M}$ GST-PEX9 durante 30 minutos fueron sometidas a ensayos de quimiotaxis (A), migración transendotelial (B) e invasión a través de Matrigel (C) en respuesta a la quimioquina CXCL12, En todos los casos la migración se inhibía manera significativa (** $p < 0,01$).

A continuación quisimos comprobar si GST-PEX9 tenía algún efecto *in vivo*. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de migración a diferentes tejidos (proceso denominado “homing” o anidamiento) en ratones. Se inyectaron células de LLC por vía intravenosa en la cola de ratones NOD/SCID de 6 a 8 semanas. Tras 24 horas los ratones fueron sacrificados y se extrajo el bazo y la médula ósea. La migración celular a los distintos tejidos se determinó por PCR mediante análisis del CD19 humano. Como se observa en la Figura 27A las células LLC migraron tanto a bazo como a médula ósea y el proceso fue inhibido cuando las células habían sido pretratadas con proMMP-9. Las células tratadas con GST-PEX9 mostraron una disminución en la migración a médula ósea pero no a bazo, sugiriendo que el efecto del PEX9 se centra en la inhibición de la integrina $\alpha 4\beta 1$, ya que se ha demostrado que la migración a médula ósea es mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$ [81]. También se analizó la migración de las células LLC *in vivo* por citometría de flujo. Se inyectaron células LLC marcadas con el colorante vital CFSE y a las 3 horas se sacrificaron los animales, se extrajeron la médula ósea y el bazo y se colectó la sangre periférica. Estos órganos se disgregaron y con la sangre periférica se pasaron por el citómetro de flujo. Como se observa en la Figura 27B tanto la proMMP-9 como el GST-PEX9 inhibían significativamente la migración celular a ambos órganos.

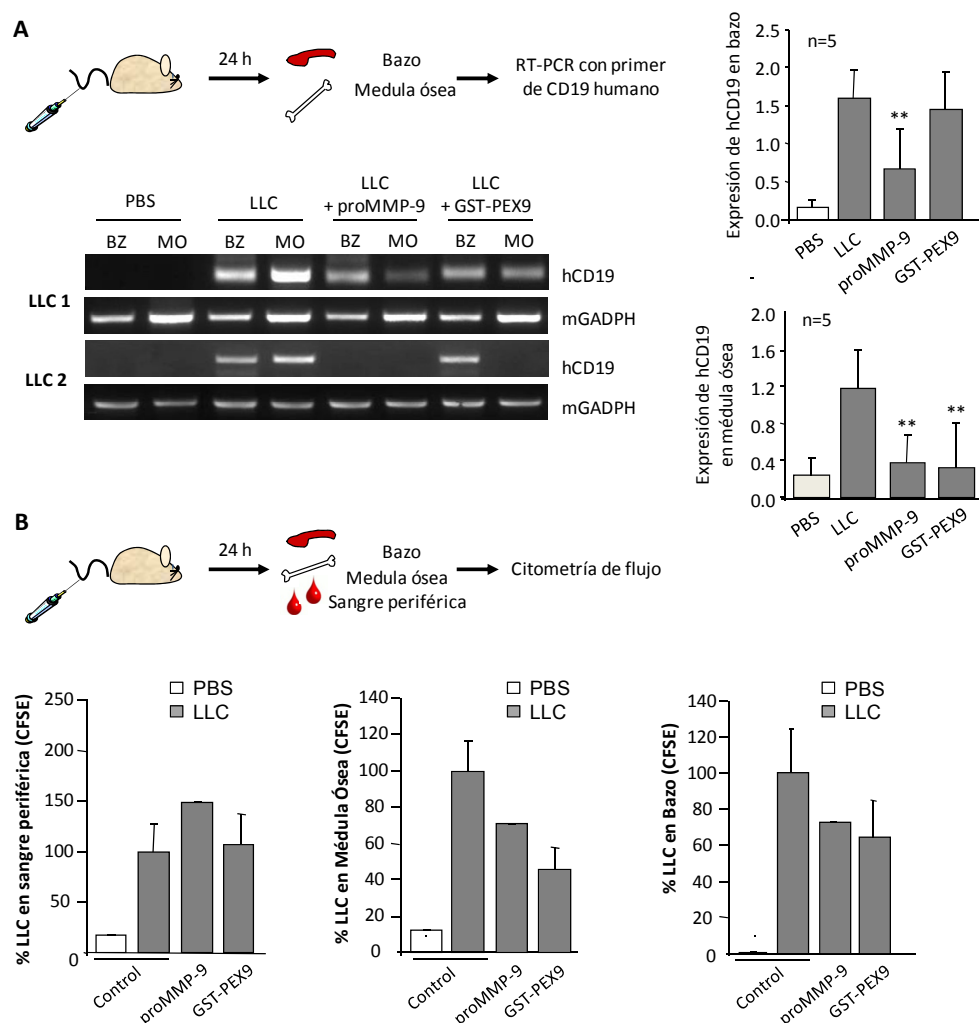


Figura 27. La incubación de células LLC con GST-PEX9 inhibe la migración a bazo y médula ósea: (A) Células de pacientes de LLC pretratadas o no con 0.6 μ M GST-PEX9 y 110 nM proMMP-9 fueron inyectadas de forma intravenosa en la cola de ratones NOD/SCID. Tras 24 horas (A) o 3 horas (B), se analizó la migración de las células a los órganos indicados a través de RT-PCR (A) o citometría de flujo (B). La migración a esos órganos fue inhibida por GST-PEX9 y proMMP-9 de manera significativa (** $p < 0,01$). Bazo (BZ), Médula ósea (MO).

El cultivo sobre GST-PEX9 induce señales de supervivencia en células LLC

Como ya habíamos demostrado que la proMMP-9 inducía supervivencia en las células LLC [177], quisimos determinar si ocurría lo mismo con el dominio PEX9. Para ello analizamos la modulación de las proteínas Lyn y Mcl-1. Como se observa en la Figura 28 tanto la proMMP-9 como el GST-PEX9 inducían un aumento de la fosforilación de Lyn y una mayor expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1. Estos datos demuestran que GST-PEX9 es capaz de inducir supervivencia celular con la misma eficiencia que la proMMP-9 completa.

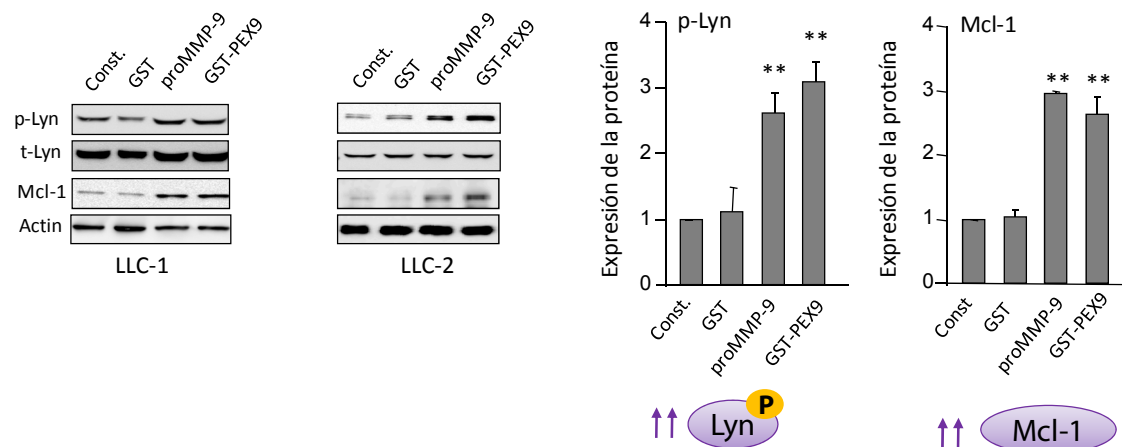


Figura 28. GST-PEX9 induce fosforilación de Lyn y expresión de Mcl-1: Células LLC fueron cultivadas sobre proMMP-9 (110 nM) o GST-PEX9 (0.2 μ M) y se analizó, por *Western blot*, la fosforilación de Lyn tras 30 minutos y de Mcl-1 a las 24 horas. Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones obtenidas de los *Western blots* (**p<0.01).

El PEX9 inhibe el crecimiento tumoral de xenotransplantes de células MEC-1

Diferentes estudios en otros sistemas celulares habían demostrado que el PEX2 y el PEX9 eran capaces de inhibir el crecimiento de tumores en modelos de xenotransplante. Con el fin de estudiar si PEX9 inhibía el crecimiento de células LLC, se generaron tumores subcutáneos en ratones NOD/SCID de 6-8 semanas mediante la inyección de células MEC-1. Cuando los tumores fueron palpables se inyectó GST-PEX9 o PBS como control. Cuando los ratones no tratados presentaban tumores de un tamaño aproximado de 500 mm³ los animales fueron sacrificados. En todos los casos el dominio PEX9 inhibía el crecimiento del tumor (Figura 29).

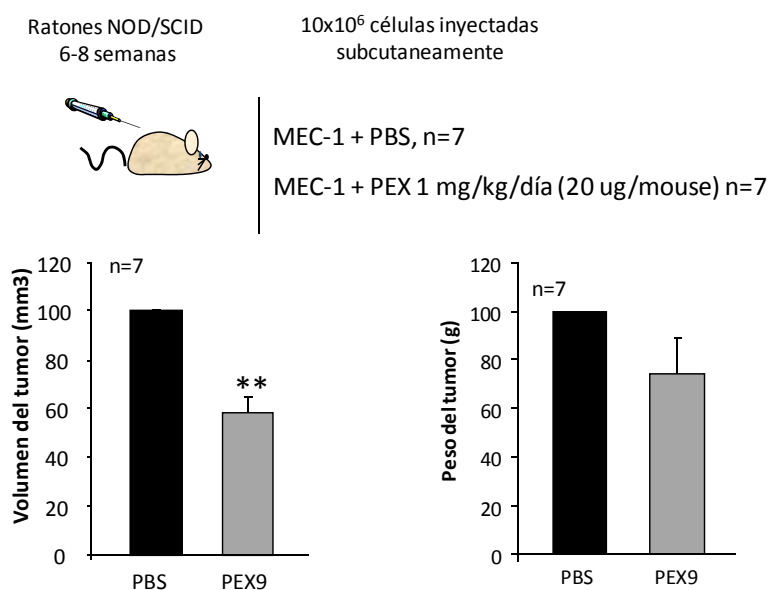
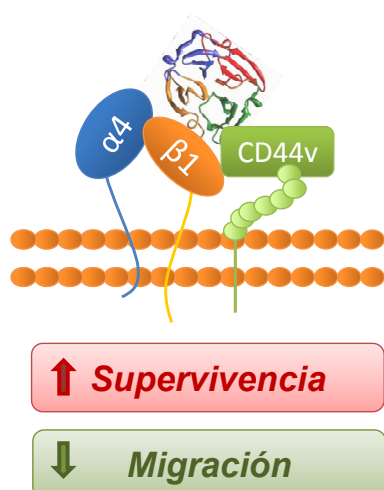


Figura 29: Efecto de GST-PEX9 en los tumores generados con células MEC-1 en ratones NOD-SCID. La disminución del tamaño del tumor en respuesta a GST-PEX9 es significativa (**p<0,01).



Todos estos datos demostraron que el dominio PEX9 de la proMMP-9 es capaz de unirse a las células LLC inhibiendo la migración y aumentando las señales de supervivencia celular, y que el tratamiento con GST-PEX9 de los tumores generados por células MEC-1 bloqueaba el crecimiento de éstos.

Figura 30: Esquema de los efectos de la unión del dominio PEX9 a la membrana de células LLC.

CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE PEX9 A CÉLULAS DE LLC

Las células LLC son capaces de unirse a las construcciones GST-D1D2 y GST-D3D4 de PEX9 de manera independiente y a través de diferentes receptores.

Una vez demostrado que PEX9 era capaz de unirse a las células LLC nos propusimos determinar el/los subdominio(s) implicado(s) en esta unión. Dado que PEX9 contiene 4 subdominios, en experimentos iniciales se construyeron proteínas recombinantes que expresaban cada uno de los subdominios de manera independiente (GST-D1, GST-D2, GST-D3, GST-D4) (Figura 31) y se probaron como sustratos en ensayos de adhesión. En resultados no mostrados se observó que las células LLC no eran capaces de unirse a ninguna de estas proteínas.

A continuación se generaron y purificaron entonces nuevas proteínas deleccionando cada uno de los subdominios por separado (GST-ΔD1, GST-ΔD2, GST-ΔD3 GST-ΔD4) (Figura 31). Los ensayos de adhesión sobre estas proteínas mostraron que todas ellas mediaban adhesión de células LLC, y a niveles similares a los inducidos por el dominio GST-PEX9, por lo que estas construcciones no fueron válidas para la identificación de sitios activos en este dominio.

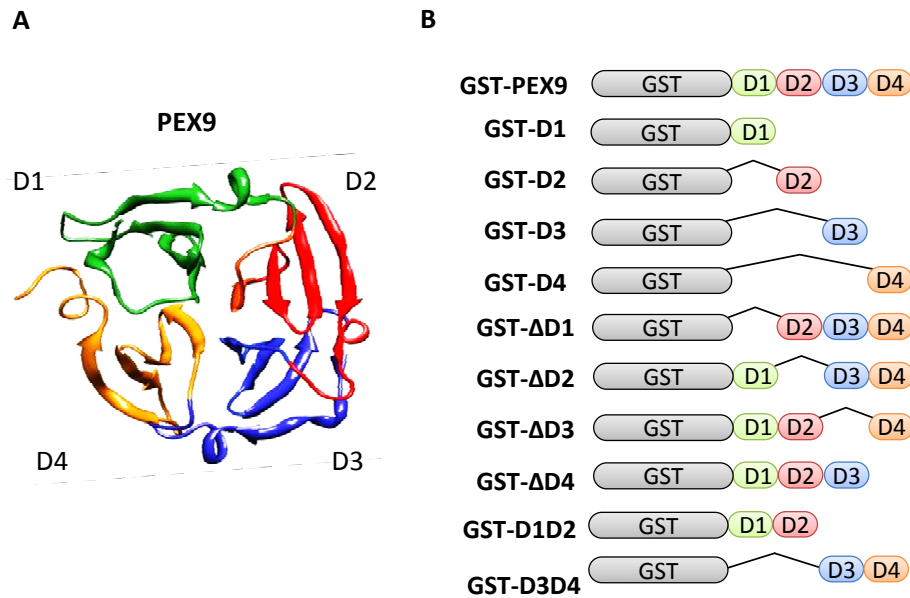


Figura 31. Representación esquemática del dominio PEX9 y de las diferentes proteínas de fusión generadas en este trabajo: (A) Estructura cristalina del PEX9 (PDB entrada ITV). (B) Esquemas de las proteínas de fusión a GST generadas, indicando los subdominios (D1-D4) que presenta cada construcción.

Se llevaron a cabo entonces, dos nuevas construcciones que contenían dos subdominios cada una: GST-D1D2 y GST-D3D4 (Figura 31). Una vez comprobada su pureza por geles de poliácridamida (Figura 32A) se llevaron a cabo ensayos de adhesión con dosis crecientes de estas proteínas y de GST-PEX9. Como se observa en la Figura 32B las células LLC se unían a estas proteínas de forma dosis dependiente siendo algo mayor la adhesión a GST-D3D4 que a GST-D1D2. Para confirmar estos datos se realizaron ensayos de adhesión con células MEC-1. En este caso, las diferencias entre la adhesión a GST-D3D4 y a GST-D1D2 eran claramente significativas (Figura 32C). Esto podría deberse a que las regiones D1D2 y D3D4 se unieran a diferentes receptores ($\alpha 4\beta 1$ y CD44v), que podrían tener diferente afinidad y/o expresión en células LLC.

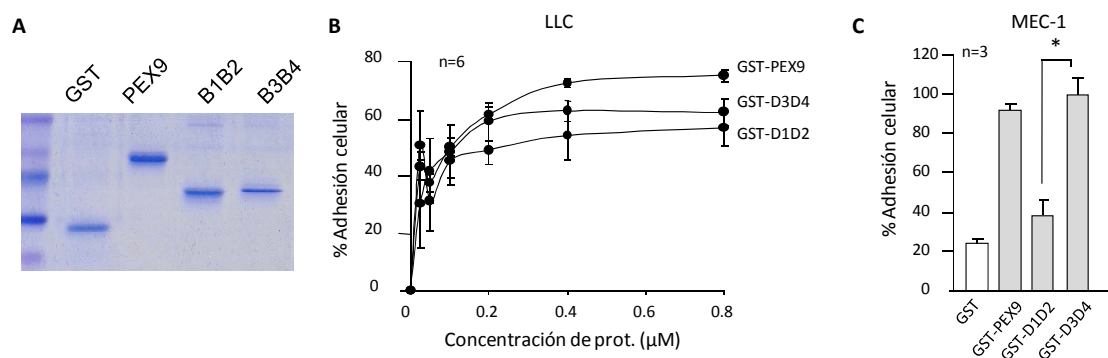


Figura 32. Las células de paciente de LLC se unen a las proteínas recombinantes GST-D1D2 y GST-D3D4: (A) Análisis por gel de poliácridamida teñido con Comassie de las proteínas GST-PEX9 GST-D1D2 y GST-D3D4. (B) Ensayo de adhesión de células LLC a concentraciones crecientes de GST-PEX, GST-D1D2 y GST-D3D4. (C) Adhesión de células MEC-1 a GST-PEX9, GST-D1D2 y GST-D3D4 (0.4 μ M). La diferencia de adhesión entre GST-D1D2 y GST-D3D4 fue significativamente diferente * $p < 0,01$.

Con el fin de corroborar esta hipótesis, se realizaron ensayos de adhesión a GST-D1D2 y GST-D3D4, preincubando, o no, las células LLC con inhibidores de $\alpha 4\beta 1$ y de CD44 los dos receptores de (pro)MMP-9. Como se muestra en la Figura 33A, el anticuerpo anti-CD44 HP2/9 inhibía significativamente la adhesión a GST-D1D2 mientras que su efecto sobre la adhesión a GST-D3D4 era muy limitado. Por el contrario HP2/9 apenas afectaba la adhesión a GST-D3D4, pero ésta era casi completamente bloqueada por el anticuerpo anti- $\alpha 4$ HP2/1. El anticuerpo control HP1/7 no tenía efecto en ningún caso (Figura 33). Estos resultados se confirmaron también con células MEC-1 cuya adhesión a GST-D3D4 era completamente inhibida por el anticuerpo HP2/1 (Figura 33)

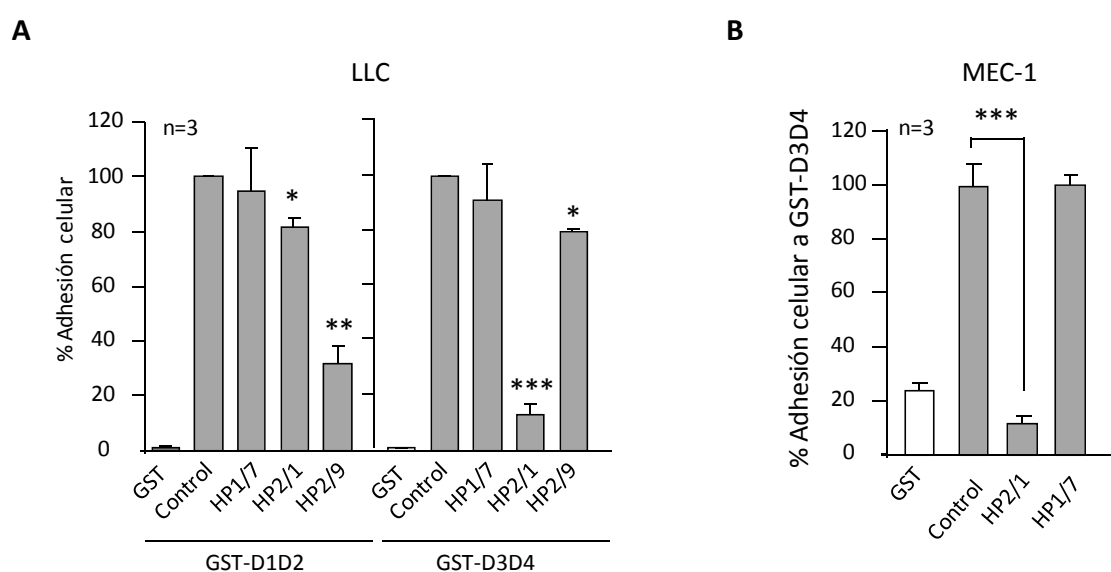


Figura 33. La adhesión de células LLC a GST-D1D2 y GST-D3D4 es a través de diferentes receptores: (A) Células LLC preincubadas con los anticuerpos indicados se sometieron a ensayos de adhesión sobre 0.2 μ M GST-D1D2 o GST-D3D4 (** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). (B) Adhesión de células MEC-1 pretratadas o no, con los anticuerpos anti- $\alpha 4$ mostrados en la figura sobre 0.4 μ M GST-D3D4 La inhibición fue significativa (*** $p < 0,001$).

Se estudió también si las proteínas GST-D1D2 y GST-D3D4 en forma soluble se unían a las células LLC y MEC-1. Los resultados observados en las células MEC-1 fueron similares a los obtenidos en la adhesión celular, es decir, no se observó unión GST-D1D2 a estas células, mientras que GST-D3D4 se unía de forma eficiente (Figura 34). En el caso de células LLC primarias se observó también una unión eficiente de GST-D3D4 soluble y una unión heterogénea y significativamente menor de GST-D1D2 (Figura 34). La proteína GST no se unía a las células en ningún caso (no mostrado).

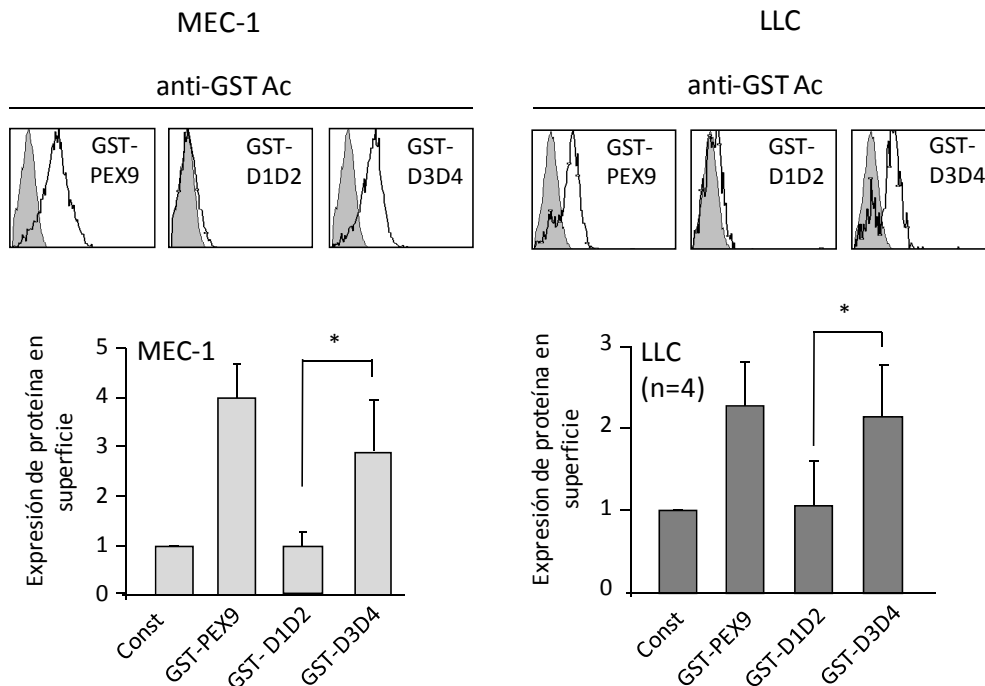


Figura 34. Las células LLC y MEC-1 unen en forma soluble a GST-D3D4: Células de paciente de LLC y de la línea celular MEC-1 fueron incubadas con las proteínas recombinantes indicadas (0.6 μ M y 0.4 μ M para MEC-1 y LLC, respectivamente) y tras 30 minutos, se analizó la unión soluble por citometría de flujo mediante la detección con un anticuerpo anti-GST (* $p < 0,05$).

Las proteínas GST-D1D2 y GST-D3D4 inhiben la migración de células LLC

Dado que el dominio GST-PEX9 completo inhibía la migración de células LLC (Figura 35), estudiamos si las regiones D1D2 y D3D4 tenían el mismo efecto. Para ello, se realizaron ensayos de quimiotaxis y de migración transendotelial a través de células HUVEC en respuesta a la quimioquina CXCL12. Como se observa en la Figura 35, tanto GST-D1D2 como GST-D3D4 inhibían significativamente ambos procesos y al mismo nivel que el GST-PEX9 completo.

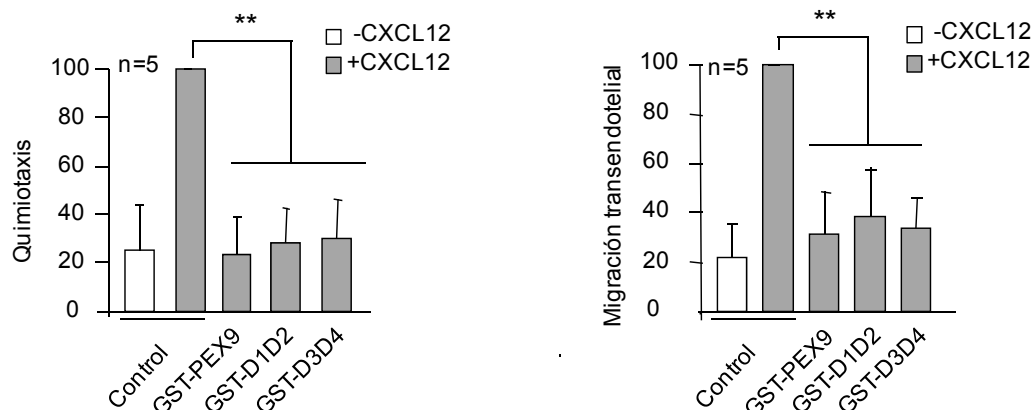


Figura 35. Las proteínas GST-D1D2 y GST-D3D4 inhiben la migración de células de paciente de LLC en respuesta a CXCL12: Células LLC fueron preincubadas con las proteínas indicadas (0.4 μ M), y tras 30 minutos se realizaron ensayos de quimiotaxis (A) y de migración transendotelial (B) hacia CXCL12. Después de 24 horas, se analizó el número de células que habían migrado por citometría de flujo. La inhibición de la migración por estas proteínas fue significativa (** $p < 0,01$).

Todos estos resultados indicaban que el dominio PEX9 se une significativamente a células LLC y contribuye a su patología al inducir señales de supervivencia y regular la migración celular. Por otra parte nuestros datos establecían que las regiones D1D2 y D3D4 del dominio PEX9 se unían a células LLC a través de diferentes receptores celulares: CD44v y $\alpha 4\beta 1$ respectivamente, y producían los mismos efectos en migración que el PEX9. Dado que el PEX9 podría ser una buena diana terapéutica en LLC, nos planteamos identificar los sitios de interacción celular específicos con el fin de bloquear la unión de la proMMP-9 a las células LLC.

IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN A LA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$ EN LA REGIÓN D3D4 DEL DOMINIO PEX9

Identificación de una secuencia de unión a $\alpha 4\beta 1$ en el subdominio D4 de PEX9 (péptido P3).

Para identificar posibles sitios de unión a células en la región D3D4 de PEX9, se diseñaron péptidos sintéticos solapantes (P1-P5) que abarcaban esta región (Figura 36 A). Se probó entonces la capacidad de estos péptidos para inhibir la adhesión de células LLC primarias y de células MEC-1 a GST-PEX9. La Figura 36 B muestra que sólo el péptido P3 inhibía significativamente la adhesión de células LLC a PEX9, interaccionando por tanto, con la integrina $\alpha 4\beta 1$.

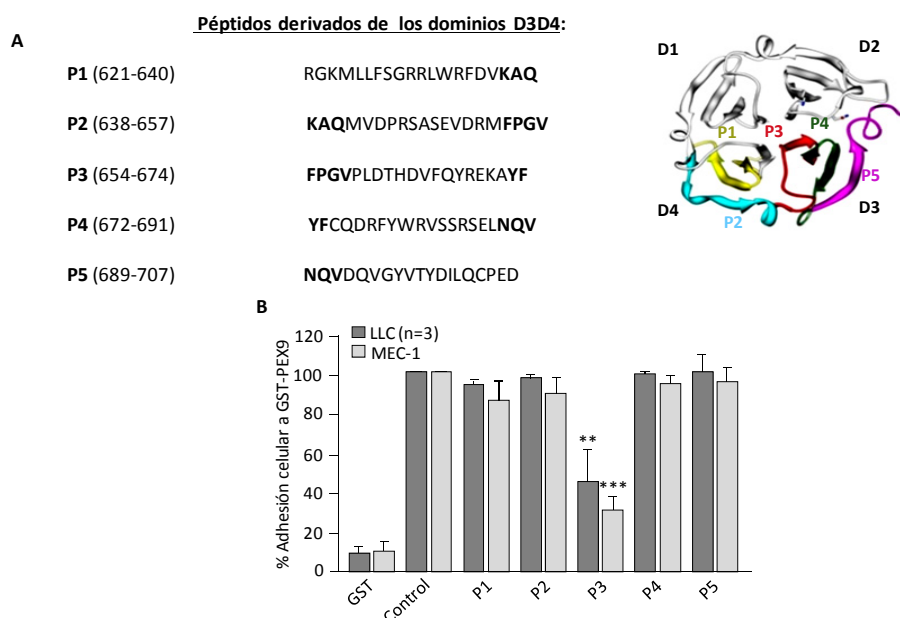


Figura 36. El péptido P3 inhibe la adhesión de células LLC y MEC-1 a GST-PEX9: (A) Secuencias de los péptidos derivados de D3D4 preparados en este estudio y su localización en el dominio PEX9. (B) Células primarias LLC y MEC-1 fueron pretratadas con 500 $\mu\text{g/ml}$ (aproximadamente 200 μM) ver Materiales y Métodos) de los péptidos durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después se realizaron ensayos de adhesión sobre GST-PEX9 (0.4 μM y 0.2 μM para MEC-1 y LLC, respectivamente). El péptido P3 inhibió la adhesión de manera significativa ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto a las células control.

Numerosos trabajos anteriores han establecido que los residuos de aspártico presentes en muchos ligandos juegan un papel fundamental para su reconocimiento por algunas integrinas [178]. El péptido P3 presentaba dos residuos de aspártico (Figura 37A) por ello diseñamos nuevos péptidos derivados del P3 con el fin de analizar la importancia de estos residuos (Figura 37B). En primer lugar se diseñaron dos péptidos más cortos acotando los residuos de aspártico, a los que denominamos P3a y P3b, y analizamos, su efecto sobre la adhesión. Ambos péptidos inhibían la adhesión de las células LLC y MEC-1 a GST-PEX9 y a proMMP-9 (Figura 37B y C). A continuación, se mutaron los residuos de aspártico a alanina en el péptido P3a (P3am) y se realizaron ensayos de inhibición de la adhesión. Como se muestra en la Figura 37B y C el péptido P3am no inhibía la adhesión de células LLC a GST-PEX9 ni a proMMP-9. Como control se utilizó un péptido conteniendo la secuencia de P3a invertida (P3arv).

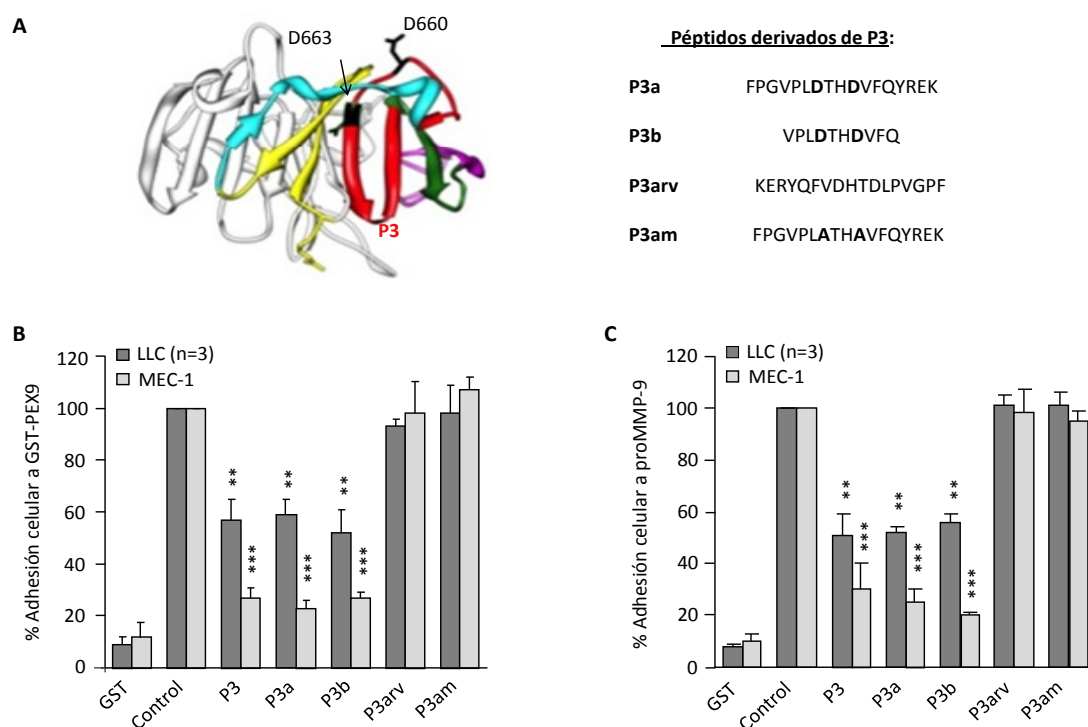


Figura 37: El efecto de los péptidos derivados de P3 son esenciales en la adhesión de células LLC y MEC-1 a GST-PEX9 y proMMP-9: (A) Localización espacial en el PEX9 de los residuos de aspártico del péptido P3 y secuencias de aminoácidos de los péptidos diseñados derivados de P3. Péptido con la mutación D-A (P3am); péptidos más pequeños (P3a, P3b) y un péptido control con la secuencia invertida del P3a (P3arv). (B, C) Células primarias de LLC y MEC-1 pretratadas con los péptidos indicados (500 µg/ml) fueron sometidas a ensayos de adhesión sobre GST-PEX9 (B) y proMMP-9 (C). La inhibición producida por los péptidos P3 y P3a y P3b fue significativa $**p<0,01$ y $***p<0,001$ en células primarias y MEC-1 respectivamente, respecto a las células control sin incubar con los péptidos.

Se probó también la actividad de los péptidos derivados de P3 en la unión de GST-PEX9 o proMMP-9 soluble a células LLC y MEC-1. De nuevo la preincubación de las células con los péptidos P3, P3a y P3b inhibía la unión de GST-PEX9 y proMMP-9 a la superficie celular, mientras que los péptidos P3am y P3arv no tenían efecto. (Figura 38).

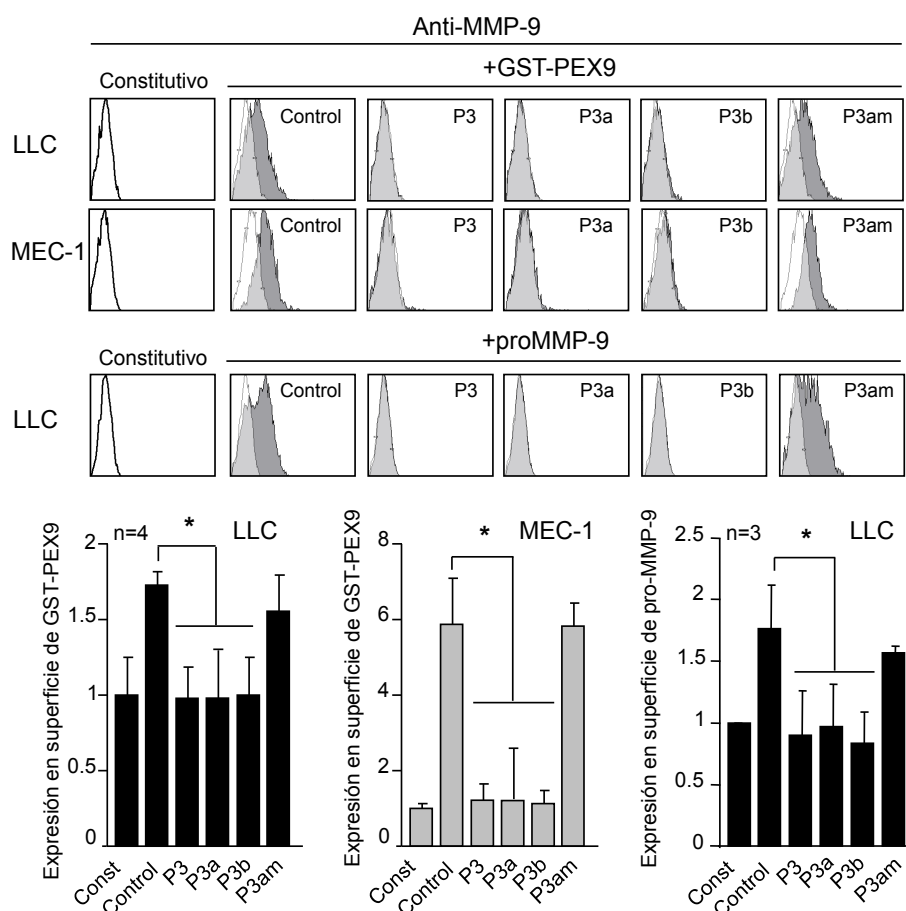


Figura 38. Los péptidos P3, P3a y P3b inhiben la unión de GST-PEX9 y proMMP-9 soluble a la superficie de células LLC y MEC-1: La unión soluble de GST-PEX9 y proMMP-9 a las células fue detectada con el anticuerpo anti-MMP-9 mediante citometría de flujo, después de tratar o no, las células con 500µg/ml de los péptidos indicados. Las gráficas de barras representan la media de intensidad de fluorescencia obtenida por el citrómetro. En todos los casos el valor obtenido de la expresión constitutiva se normalizó a 1. La inhibición producida por P3, P3a y P3b fue significativa (*p<0,05) respecto a las células control sin tratar.

El péptido P3 inhibe específicamente la unión de células LLC a GST-PEX9 pero no a otros ligandos de la integrina $\alpha 4 \beta 1$.

La integrina $\alpha 4 \beta 1$ tiene otros ligandos además de proMMP-9, como la región de fibronectina FN-H89 o VCAM-1 (Figura 39A) [178]. Por ello estudiamos si el péptido P3 era capaz de inhibir también la adhesión de células LLC a estos ligandos. Como se muestra en la Figura 39B el péptido P3 no inhibía la adhesión de células LLC a VCAM-1 ni a FN-H89, mientras que en el mismo ensayo bloqueaba la unión de las células a GST-PEX9. Por el contrario, el péptido CS1, conocido inhibidor de la integrina $\alpha 4 \beta 1$, bloqueaba la adhesión a los ligandos de $\alpha 4 \beta 1$. Estos datos parecen indicar que el péptido P3 era un inhibidor específico de la unión de proMMP-9 a $\alpha 4 \beta 1$.

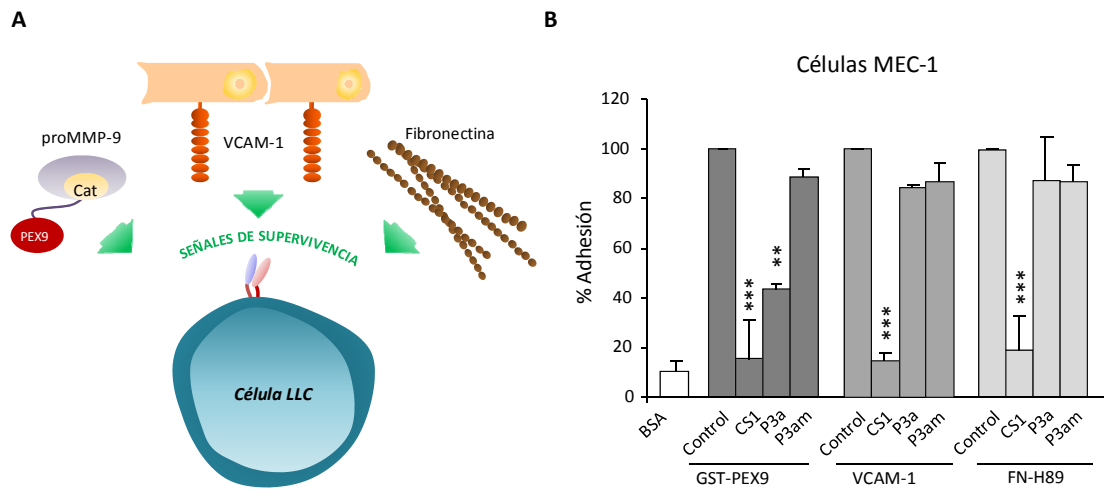


Figura 39. El péptido P3 inhibe específicamente la adhesión de células LLC a GST-PEX9: (A) Representación de diferentes ligandos de la integrina $\alpha 4 \beta 1$. (B) Células MEC-1 fueron preincubadas con los péptidos indicados y se sometieron a ensayos de adhesión sobre GST-PEX9, VCAM-1 y FN-H89. Tras 1 hora, se cuantificó la adhesión. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El péptido P3 inhibe la migración celular y la señalización inducida por proMMP-9 o GST-PEX9

Analizamos si el P3 era capaz de inhibir la señalización inducida por proMMP-9 o GST-PEX9 y la migración celular en respuesta a CXCL12. Células LLC fueron tratadas con GST-PEX9 o con los péptidos P3, P3a, P3b, P3am o P3arv tras 24 horas, se analizaron las células que habían migrado por citometría de flujo. La Figura 41 muestra que GST-PEX9, P3, P3a y P3b inhibían la migración mientras que los péptidos P3am y P3arv no tenían ningún efecto.

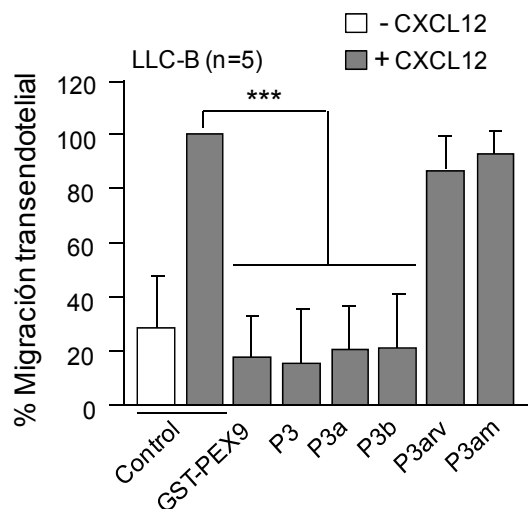


Figura 40. El péptido P3 inhibe la migración transendotelial de las células LLC hacia CXCL12: Células de 5 pacientes de LLC fueron tratadas con los péptidos indicados o con GST-PEX9 durante 30 minutos y se añadieron a transwell previamente tapizados con HUVEC. Tras 24 horas se cuantificó el porcentaje de migración hacia CXCL12. La inhibición fue muy significativa (** $p < 0.001$)

Por último, analizamos si los péptidos P3a y P3am inhibían la señalización de supervivencia inducida por la adhesión a proMMP-9 o GST-PEX9, es decir, la fosforilación de Lyn y el aumento de la expresión de GST-PEX9 (ver figura 28). La preincubación celular con P3a inhibía significativamente la inducción de estas señales, mientras que la preincubación con P3am no tenía ningún efecto (Figura 41). Estos datos corroboran de nuevo la especificidad de los residuos de aspártico para su funcionamiento.

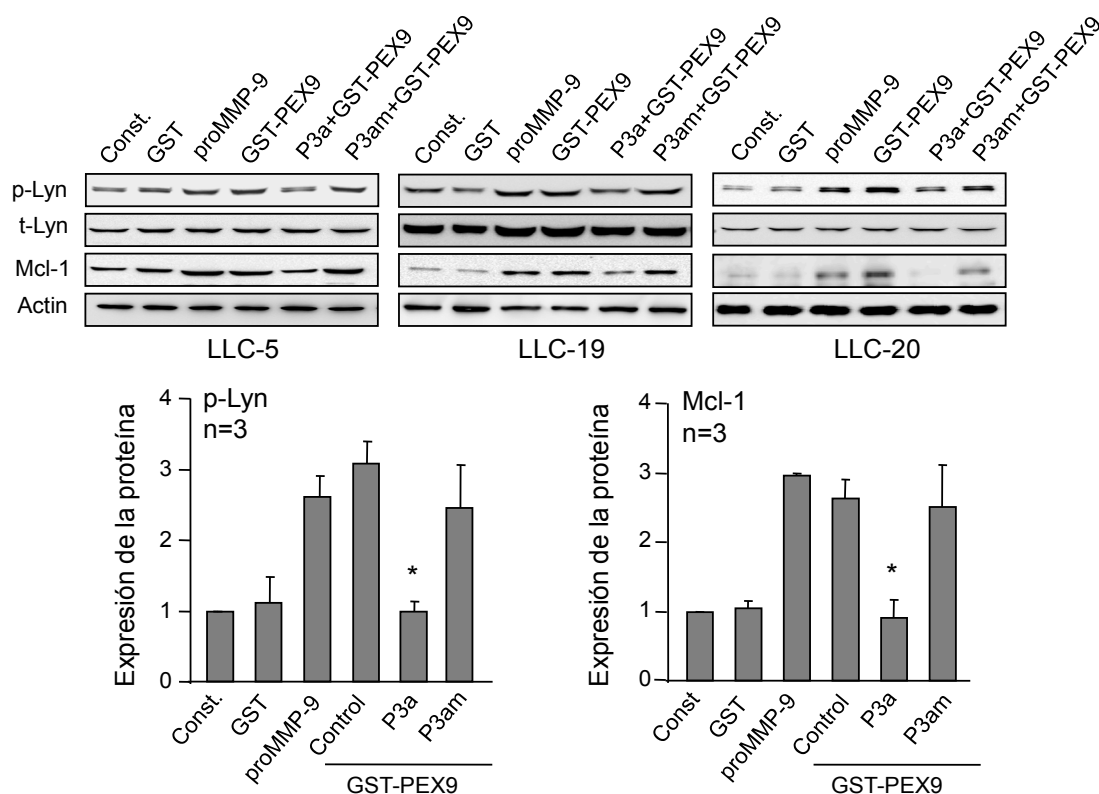


Figura 41. El péptido P3a inhibe la fosforilación de Lyn y la expresión de Mcl-1 en células LLC primarias incubadas sobre GST-PEX9 o proMMP-9: Células de 3 pacientes de LLC se preincubaron o no, con los péptidos indicados durante 30 minutos y se depositaron en placas tapizadas con proMMP-9 o GST-PEX9. A los 30 min (p-Lyn) o a las 24 horas (Mcl-1) se lisaron las células y se analizaron por Western-blot utilizando anticuerpos específicos.

Características bioquímicas de la unión de P3a a células LLC

Una vez identificada la secuencia y analizada la especificidad del péptido P3a determinamos si el efecto de este péptido era dosis dependiente, utilizando el péptido CS1 como control positivo. Como se muestra en la Figura 42A el péptido P3a inhibía la adhesión celular a GST-PEX9 de forma dosis-dependiente y con un IC₅₀= 138 μ M. El IC₅₀ de CS1 en estos ensayos era 80 μ M. Un efecto similar se observó para la inhibición de la unión de GST-PEX9 soluble por P3a (IC₅₀=199 μ M) (Figura 42B). De igual forma, la inhibición de la unión de células LLC a proMMP-9 por P3a era dosis dependiente, con un IC₅₀ de 279 μ M (adhesión celular) y 158 μ M (unión soluble) (datos no mostrados).

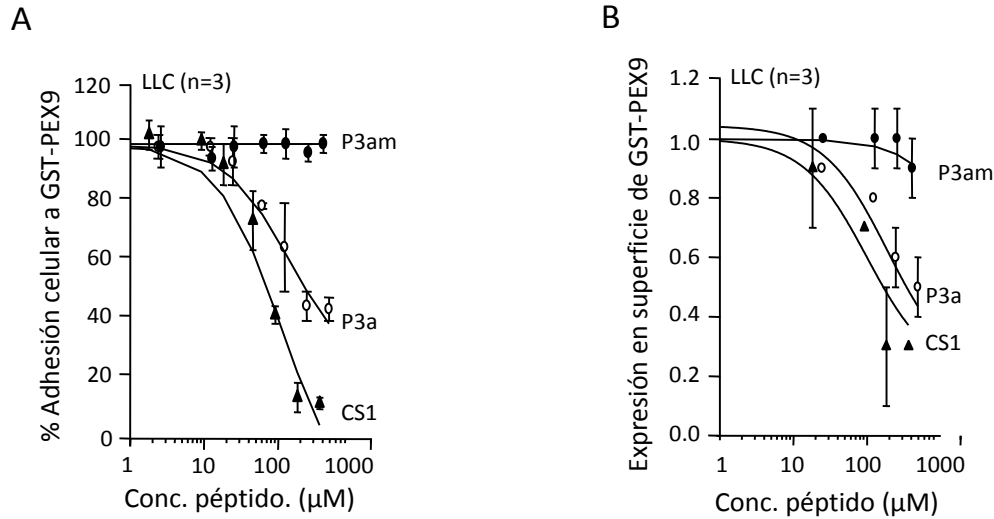


Figura 42. Efecto del péptido P3a en la inhibición de la adhesión y unión soluble a GST-PEX9 a células LLC: (A, B) Células de paciente de LLC fueron preincubadas con concentraciones crecientes de los péptidos indicados. Tras 30 minutos se realizaron ensayos de adhesión (A) o unión soluble (B) a GST-PEX9. Los valores de IC-50 se obtuvieron tras analizar los datos con el programa Sigma Plot.

Se determinó también la afinidad de los péptidos realizando ensayos de unión directa a células MEC-1. Para ello, se sintetizaron péptidos P3a, P3am, CS1 y CS3 marcados con carboxifluoresceína (CF). En primer lugar, se comprobó que los péptidos bloqueaban la unión del GST-PEX9 a las células MEC-1, corroborando que el marcaje fluorescente CF no afectaba en la función del péptido. Como se observa en la Figura 43, tanto el CF-P3a como el CF-CS1 se unían de forma dosis dependiente a las células, mientras que los péptidos controles P3am y CS3 no se unían.

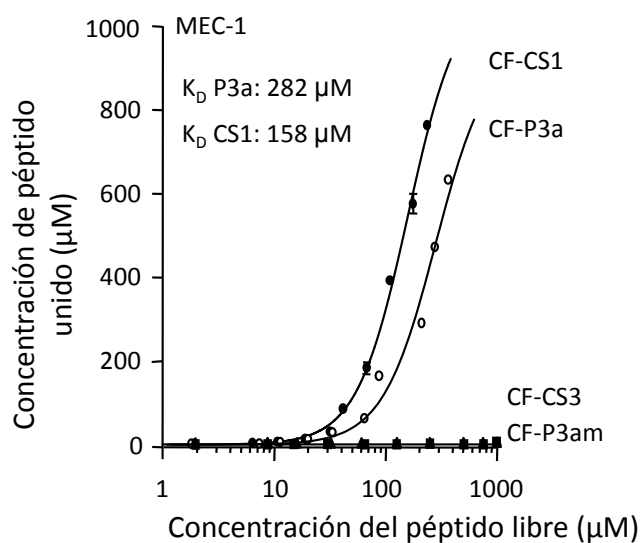


Figura 43: Análisis de la unión directa de los péptidos indicados a células MEC-1: Células MEC-1 fueron preincubadas con concentraciones crecientes de los péptidos indicados marcados con el compuesto fluorescente CF durante una hora a temperatura ambiente. Tras centrifugar, el sobrenadante con el péptido fluorescente fue cuantificado como se explica en Materiales y Métodos. Se utilizó la ecuación de Hill para estimar la curva y se calculó la KD con el software MATLAB.

Un anticuerpo policlonal antiP3 inhibe la adhesión a PEX9 y la migración a través de células HUVEC

Una vez confirmada que la región FPGVPLDTHDVFQYREKAYF era la responsable de la unión de GST-D3D4 a las células LLC, se generó un anticuerpo policlonal frente a este péptido. Se comprobó su especificidad por ensayos de ELISA con placas tapizadas con los diferentes péptidos, así como con PEX9 o con proMMP-9 todos a la misma concentración molar. En la Figura 44A se observa que el anticuerpo anti-P3 reconocía el péptido P3 y el GST-PEX9 con una intensidad similar. La baja detección de la proMMP-9 por este anticuerpo puede deberse a la estructura terciaria de esta proteína, ya que la proMMP-9 presenta una alta flexibilidad.

Corroborada la especificidad del anticuerpo se analizó su posible actividad en la adhesión celular a PEX9 y proMMP-9. Las células se añadieron a pocillos tapizados con GST-PEX9 o proMMP-9, previamente preincubados o no con anti-P3 o con un anticuerpo policlonal control. Se observó que el anticuerpo anti-P3 inhibía la adhesión a estas proteínas significativamente, confirmando por tanto la especificidad del efecto de la secuencia P3 (Figura 44B).

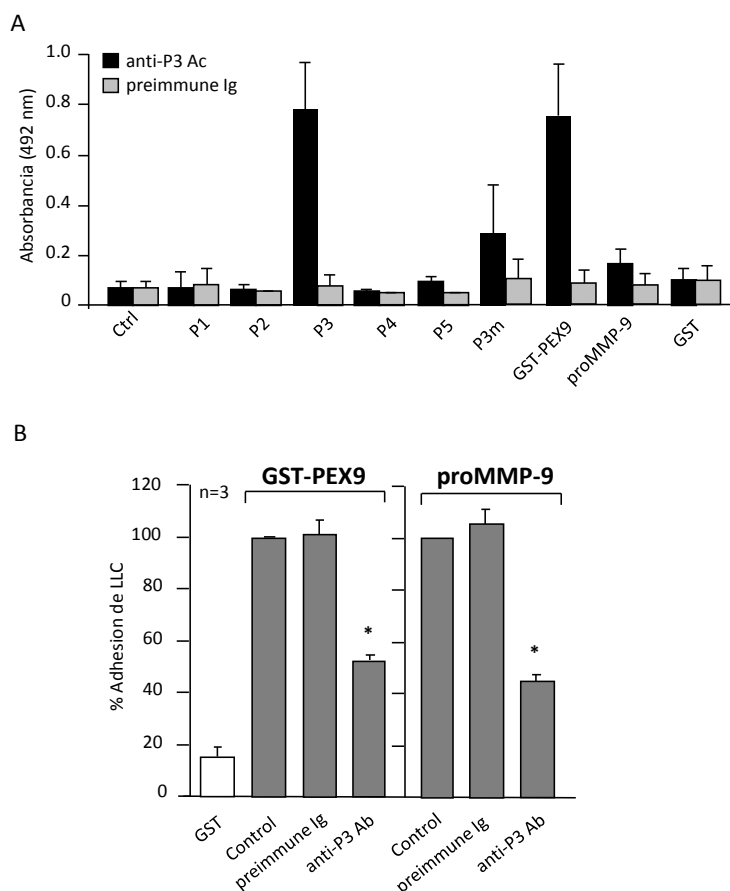


Figura 44. Especificidad del anticuerpo anti-P3 y su efecto en la adhesión de células LLC a GST-PEX9 y proMMP-9: (A) Detección por el anticuerpo anti-P3 de las proteínas y péptidos indicados mediante ELISA. (B) Células LLC fueron incubadas con los anticuerpos indicados y se sometieron a ensayos de adhesión sobre GST-PEX9 (0.4 μ M) y sobre proMMP-9 (110 nM). La adhesión fue inhibida significativamente por el anticuerpo anti-P3 (* $p < 0,05$).

Se analizó también el papel del anticuerpo anti-P3 en la migración celular. Para ello, se trataron las células, con GST-PEX9 (Figura 45A) o con proMMP-9 (Figura 45B) preincubados previamente con los anticuerpos indicados y se realizaron ensayos de migración transendotelial a través de células HUVEC. En ambos casos el anticuerpo anti-P3 restauraba la migración inhibida por GST-PEX9 y proMMP-9 indicando que este anticuerpo inhibía la unión de estas proteínas a células LLC.

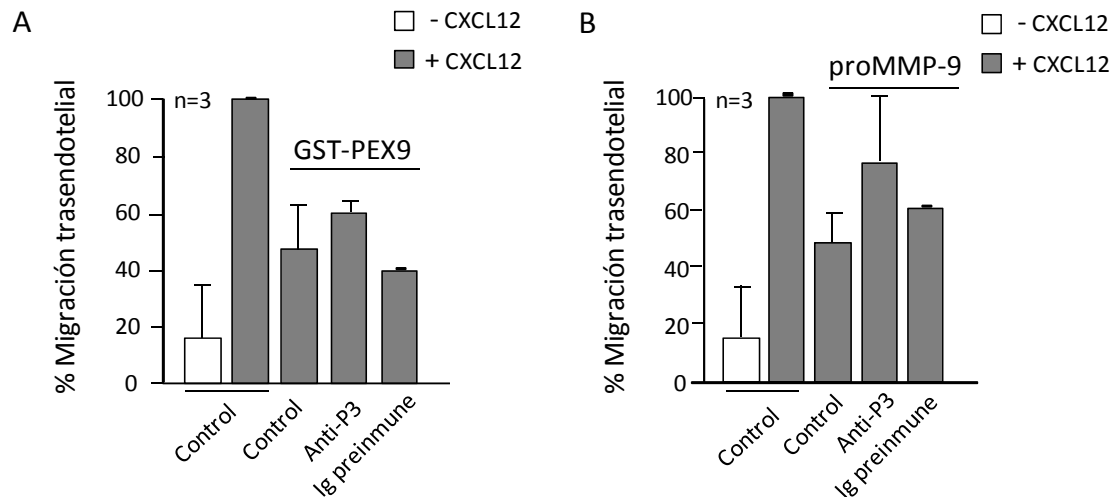


Figura 45. El anticuerpo anti-P3 restaura la migración celular inhibida por GST-PEX9 y proMMP-9: Las proteínas GST-PEX9 (A) o proMMP-9 (B) fueron o no preincubadas con los anticuerpos indicados durante 30 minutos. A continuación, fueron añadidos a las células LLC las cuales se sometieron a ensayos de migración transendotelial. Tras 24 horas, se analizó la capacidad de migración de estas células mediante conteo celular en el citómetro de flujo.

También se analizó el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-P3 en tumores subcutáneos generados en ratones NOD/SCID. Los resultados obtenidos mostraron que el anticuerpo anti-P3 inhibía de forma significativa el tamaño del tumor (Figura 46).

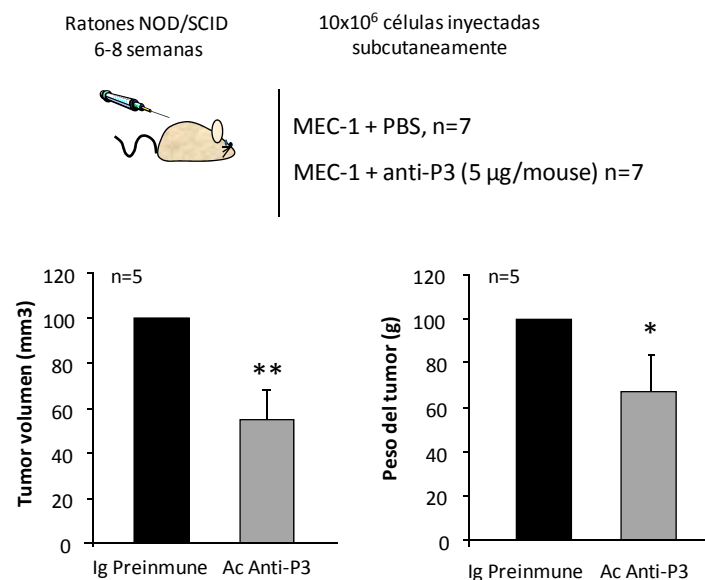


Figura 46. Cuantificación de los tumores generados por células MEC-1 en ratones NOD-SCID: La disminución del tamaño del tumor con el tratamiento con el anticuerpo anti-P3 es significativa (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN A CD44 EN LA REGIÓN D1D2 DEL DOMINIO PEX9

Identificación de secuencias funcionales en los dominios D1D2 de PEX9.

Siguiendo una aproximación similar a la empleada para el estudio de los subdominios D3D4 se sintetizaron 5 péptidos solapantes (P6-P10, residuos 521-608 de la proMMP-9) que abarcaban esta región de PEX9 (Figura 47A).

En primer lugar, se probó el efecto de los péptidos P6-P10 en la adhesión de células LLC a GST-PEX9. En ensayos iniciales los péptidos se utilizaron a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$, (equivalente a aproximadamente 200 μM). La figura 47B muestra que la preincubación celular con los péptidos P6 y P7 (subdominio 1) inhibían la adhesión a GST-PEX9. Los péptidos restantes (P8-P10) no afectaban la adhesión celular. Se obtuvieron resultados similares cuando se analizó el efecto de estos péptidos en la unión de GST-PEX9 soluble a células (Figura 47C).

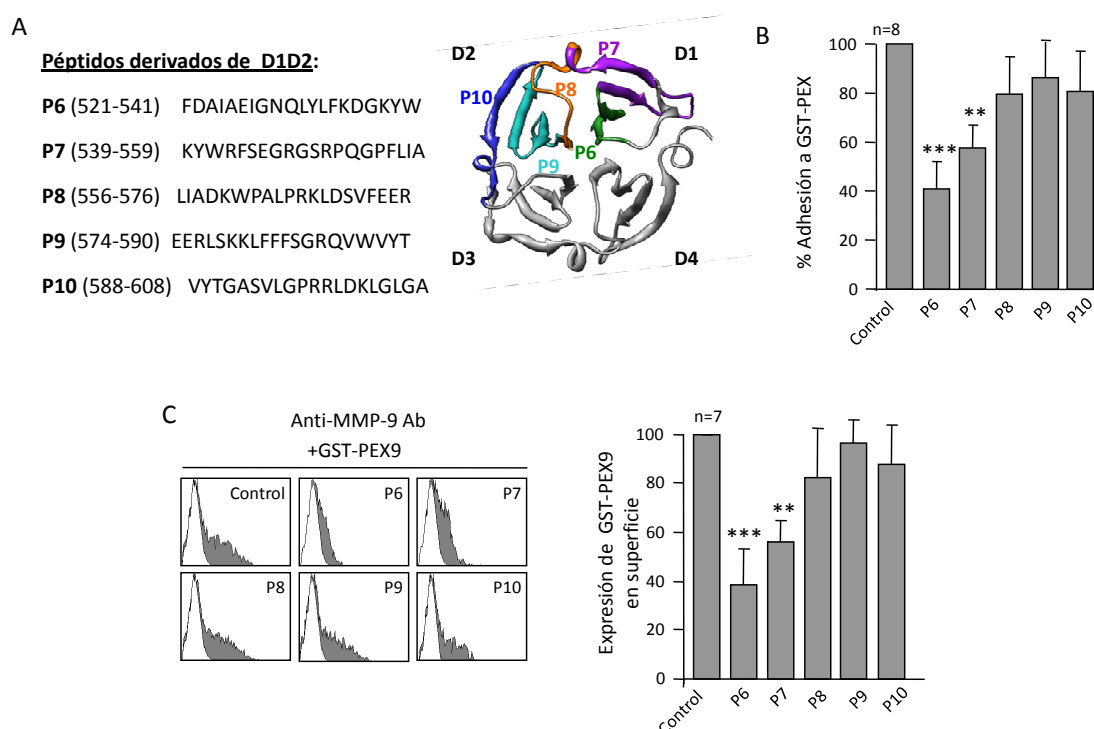


Figura 47. Los péptidos P6 y P7 inhiben la unión de GST-PEX9 a células LLC primarias: (A) Secuencia de los péptidos P6 a P10 de la región D1D2 y localización espacial de éstos en la estructura cristalina del GST-PEX9 (PDB entrada 1TV). (B) Células LLC fueron preincubadas con los péptidos indicados y tras 30 min se sometieron a ensayos de adhesión sobre GST-PEX9 (0.2 μM). (C) Ensayo de unión soluble de GST-PEX9 en las mismas condiciones que en la adhesión. La inhibición de GST-PEX9 (0.4 μM) a células de LLC por los péptidos P6 y P7 fue significativa (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

IC-50 de los péptidos P6 y P7

A continuación se realizaron ensayos de inhibición de la adhesión a GST-PEX9 utilizando diferentes dosis de péptidos, observándose un efecto dosis dependiente (Figura 48A Y B). Los valores del IC50 de los diferentes péptidos fueron calculados con el programa SigmaPlot para obtener los valores obtenidos fueron 90 μ M, 280 μ M y 35 μ M para P6, P7 y P3 respectivamente en los ensayos de adhesión (Figura 49 A) y 75 μ M, 220 μ M y 40 μ M para P6, P7 y P3 respectivamente en los ensayos de unión soluble (Figura 49 B).

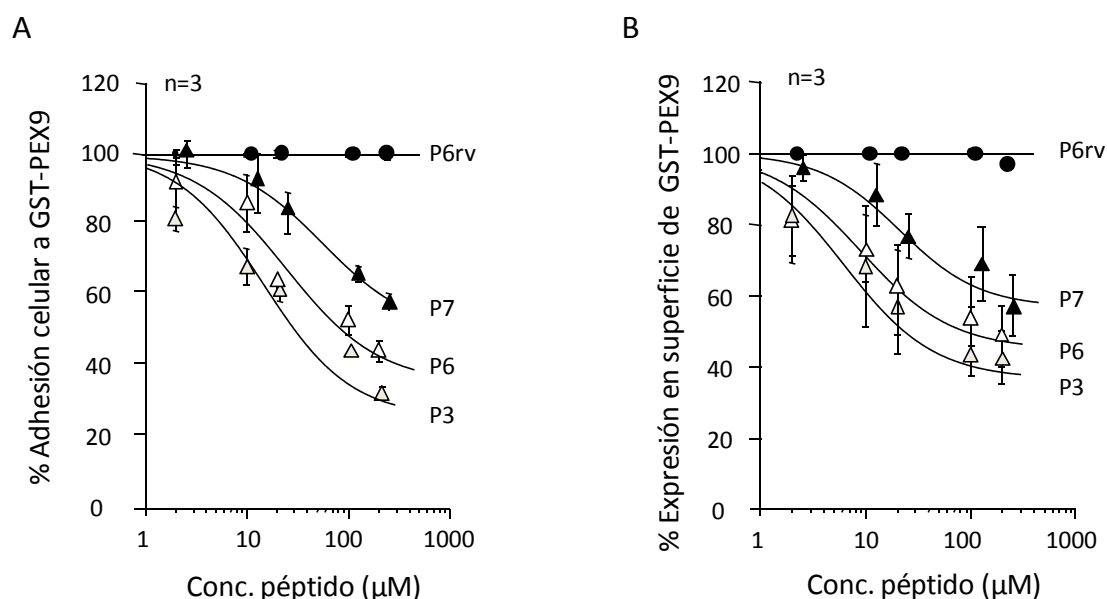


Figura 48. El efecto inhibitorio de los péptidos P6 y P7 es dosis dependiente: Células de 3 pacientes de LLC fueron preincubados con concentraciones crecientes del P3, P6 o P6rv y tras 30 minutos se realizaron ensayos de adhesión (A) o unión a GST-PEX9 soluble de los péptidos indicados(B) (0.2 y 0.4 μ M respectivamente).

Efecto de los péptidos P6 y P7 en la adhesión de células LLC a ácido hialurónico y proMMP-9.

Los resultados mostrados en la Figura 33 indicaban que la interacción de células LLC con la región D1D2 era mediada principalmente por CD44. Por tanto probamos si los péptidos P6 y P7 interferían con la adhesión a ácido hialurónico (AH), el ligando natural de CD44. En estos experimentos se utilizó también el péptido P3 (subdominio 4) previamente identificado (Figura 36) así como un péptido control que contenía la secuencia P6 invertida (péptido P6rv, Tabla 7). La preincubación de las células con P6 reducía significativamente la adhesión a AH (58%), mientras que el P7 tenía un efecto muy limitado (25% Figura 49A). El péptido P3 inhibía moderadamente (18% inhibición) y el péptido P6rv no tenía ningún efecto, confirmando la especificidad de la secuencia P6. Ambos péptidos, P6 y P7, inhibían de forma similar la adhesión celular a proMMP-9 y al mismo nivel que el péptido P3, mientras que el control P6rv no tenía efecto (Figura 49B).

Para establecer la posible especificidad de los péptidos para proMMP-9 se utilizó VCAM-1 como ligando de la integrina $\alpha 4 \beta 1$, observándose que ninguno de los péptidos afectaba a la adhesión de células LLC a VCAM-1. Estos resultados confirmaban la especificidad de acción de los péptidos P3 y P6 para bloquear interacciones celulares con proMMP-9 (Figura 49C).

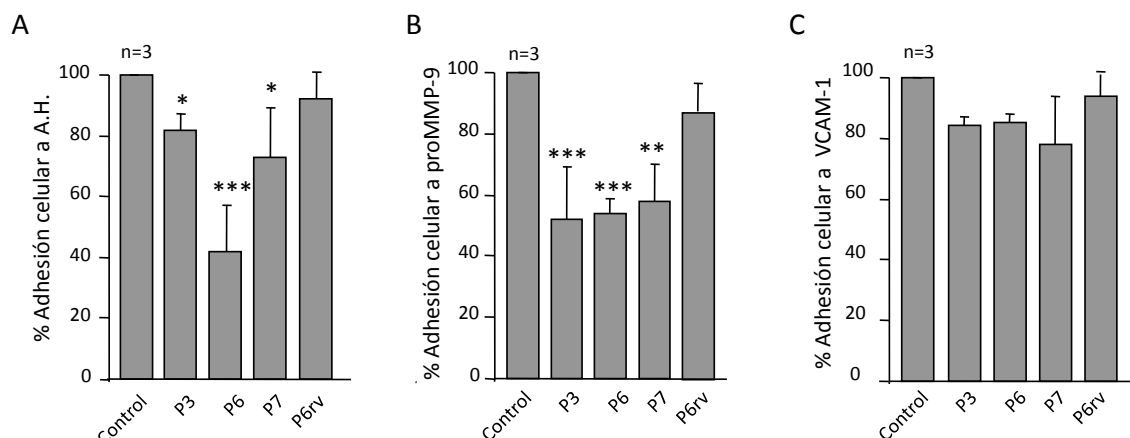


Figura 49 . Los péptidos P6, P7 y P3 inhiben la adhesión de células LLC a proMMP-9, mientras que sólo el péptido P6 inhibe la adhesión ácido hialurónico: Células LLC, preincubadas con 500 $\mu\text{g/ml}$ de los péptidos indicados, fueron sometidas a ensayos de adhesión sobre ácido hialurónico, proMMP-9 y VCAM-1 (50 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente). Tras 24 horas se cuantificó el porcentaje de células adheridas. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

La combinación de los péptidos P3 y P6 aumenta la inhibición de la adhesión celular a GST-PEX9 y de la migración celular.

Una vez demostrado que las secuencias P3 (del subdominio 4) y P6 (del subdominio 1) inhibían la unión de proMMP-9 a $\alpha 4 \beta 1$ y a CD44 respectivamente, se analizó la posible cooperación ambos péptidos. Células LLC se preincubaron o no con P3, P6, o P3+P6 y se estudió la adhesión a GST-PEX9. Los péptidos P6rv y P7 solos o en combinación con P3 y P6 fueron también analizados como controles en estos experimentos. La Figura 50A muestra que la combinación de P3 y P6 aumentaba significativamente el efecto inhibitorio de los péptidos individuales. Este aumento no se observaba combinando P7 o P6rv con P3 o P6, confirmando la cooperación específica de las secuencias P3 y P6. Además, se observó el mismo efecto cooperativo entre P3 y P6 en ensayos de unión de GST-PEX9 soluble a células LLC (Figura 50B).

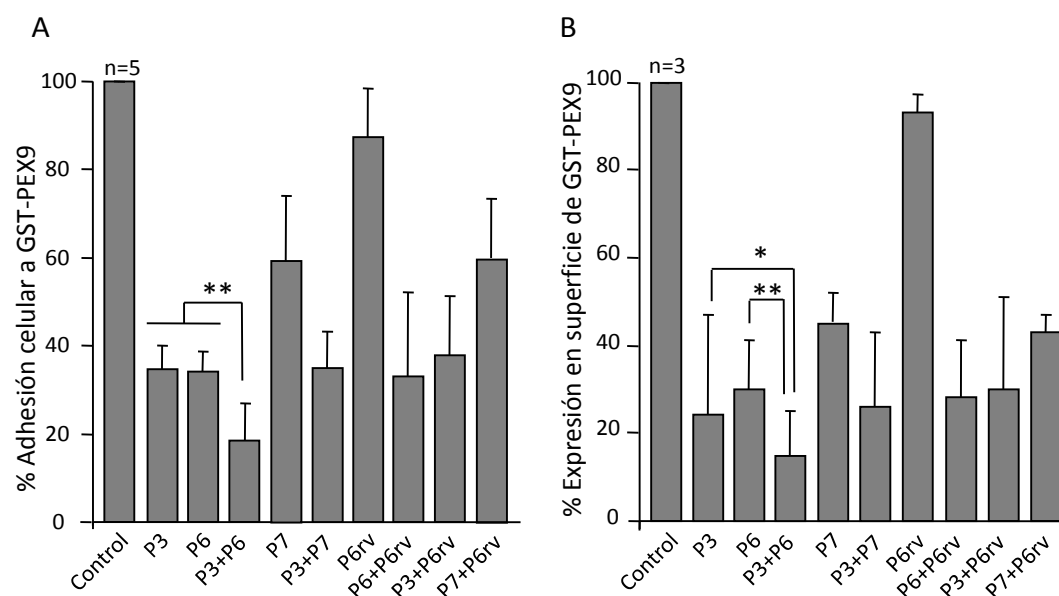


Figura 50. La combinación de los péptidos P6 y P3 aumenta el efecto inhibitorio de los péptidos individuales: Células LLC, se trataron con los péptidos indicados (200 μ M) 30 minutos y se sometieron a ensayos de adhesión (A) y unión de GST-PEX9 soluble (B) (0.2 μ M y 0.4 μ M respectivamente). La inhibición de los péptidos fue significativa. (* p <0.05, ** p <0.01).

Determinamos también el efecto de P3 y P6, así como de su combinación en quimiotaxis y migración transendotelial. La Figura 50 muestra que las células pretratadas con los péptidos P3 o P6 migraban menos que las células control tanto en quimiotaxis (Figura 51A) como en migración transendotelial (Figura 51B). La combinación de P3 y P6 aumentaba significativamente el efecto inhibitorio en ambos casos (Figura 51A y B). Con estos datos, corroboramos el efecto cooperativo de los péptidos P6 y P3 observado en adhesión y unión de GST-PEX9 soluble.

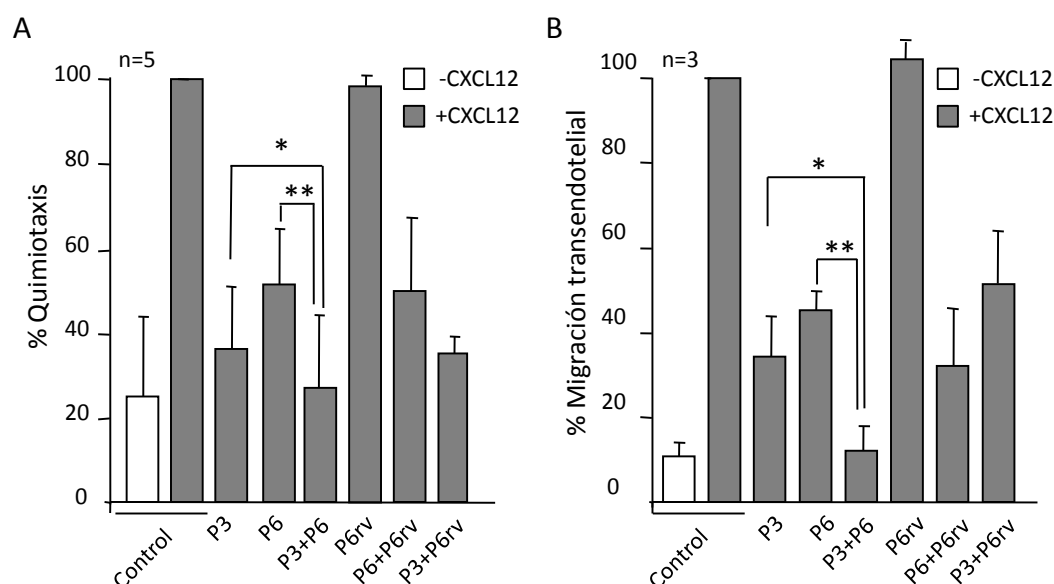


Figura 51. Los péptidos P6 y P3 inhiben la migración de LLC y actúan de manera cooperativa: Células LLC fueron preincubadas con los péptidos indicados (200 μ M) y tras 30 minutos se sometieron a ensayos de quimiotaxis o migración transendotelial a través de células HUVEC mediante estimulación con CXCL12. A las 24 horas, se recogieron las células migradas y se cuantificaron por citometría de flujo. La inhibición de la migración por los péptidos fue significativa, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Una vez establecido el efecto cooperativo de los péptidos P3 y P6, determinamos si era una cooperación sinérgica o aditiva. Para ello, se incubaron las células LLC con concentraciones crecientes de uno de los péptidos (P3 o P6 a 2, 10, 20, 100 y 200 μ M) más el otro péptido a una concentración constante y se realizaron ensayos de adhesión y de unión de GST-PEX9 soluble. Los datos de inhibición de la adhesión (Figura 52A, B) y de la unión soluble (Figura 52 C, D) fueron analizados con el programa CompuSyn (BioSoft, Cambridge, England). En todos los casos las combinaciones generaron valores de índice de combinación < 1 , por lo que pudimos concluir que los péptidos P3 y P6 actuaban de manera sinérgica (Figura 52).

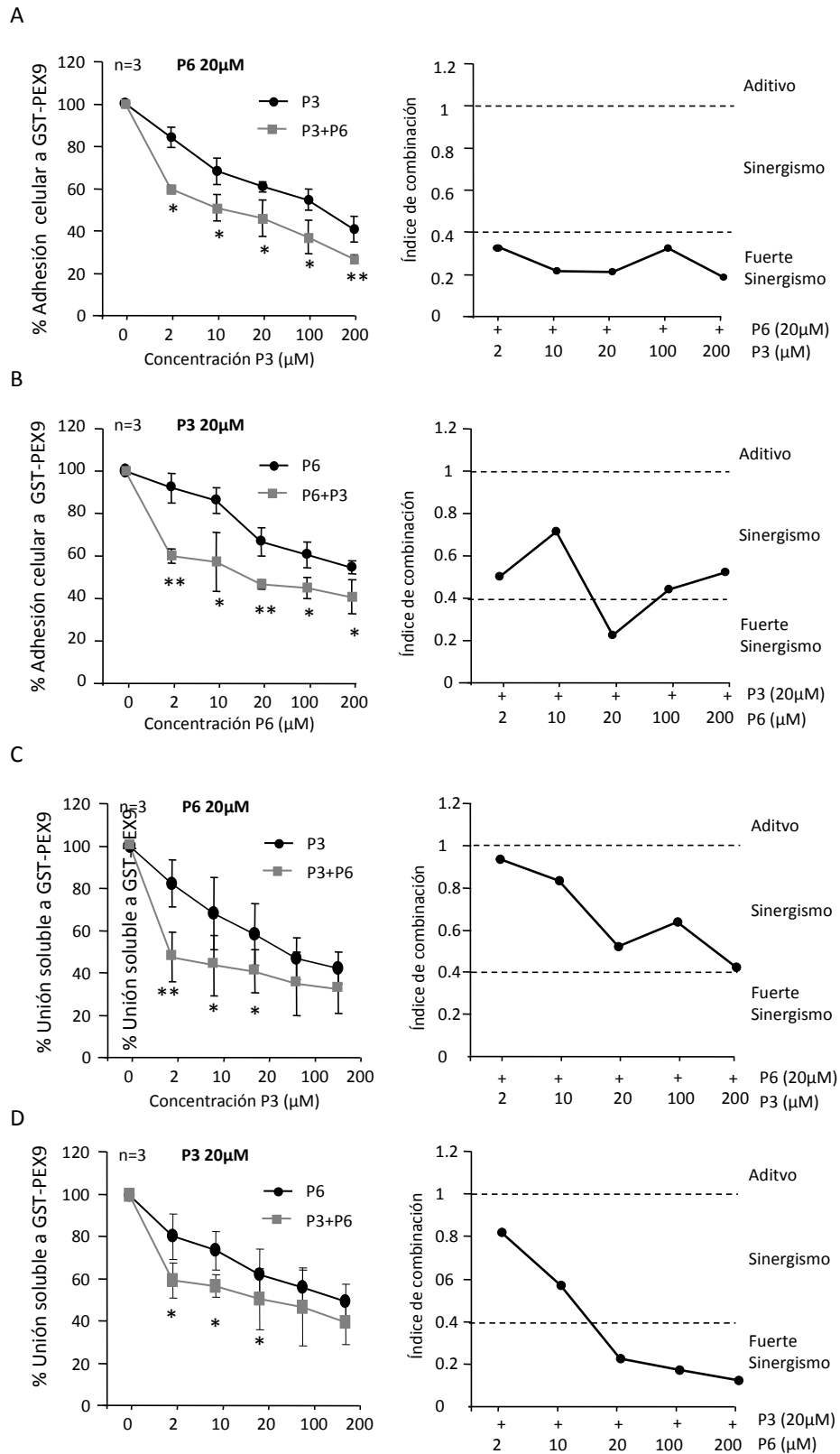
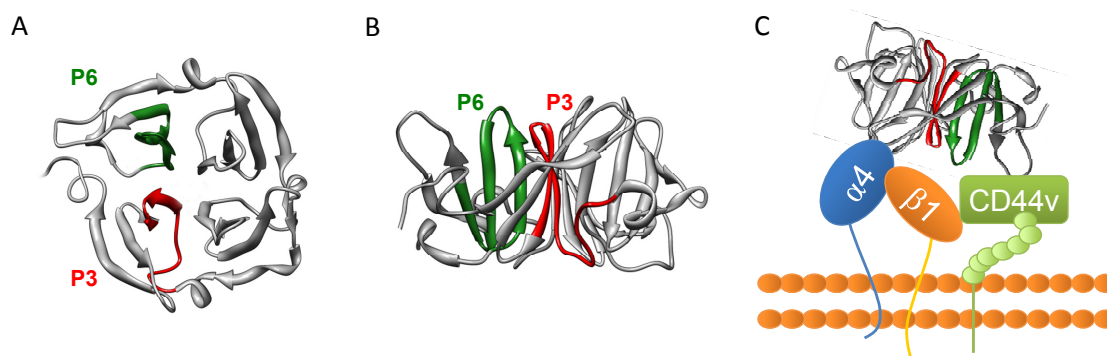


Figura 52: El efecto cooperativo de P3 y P6 es sinérgico: Células de pacientes de LLC se preincubaron con las concentraciones de péptidos que se indican y se realizaron ensayos de adhesión (A, B) y unión a GST-PEX9 soluble (C, D). En todos los casos se normalizaron los datos haciendo al control 100. Los datos obtenidos se analizaron con programa CompuSyn y se obtuvieron los Índices de Combinación (IC) representados en la gráficas.

En conjunto los datos obtenidos demuestran que la unión de proMMP-9 a la membrana de células LLC contribuye a la patogénesis de la enfermedad y que el dominio PEX9 es esencial para esta unión. Las secuencias implicadas dentro de PEX9 son P3 en el subdominio 4 y P6 en el subdominio 1 que actúan sinérgicamente y pueden constituir por tanto dianas terapéuticas en LLC.



REGULACIÓN DE (PRO)MMP-9 POR VEGF EN CÉLULAS LLC

VEGF disminuye la cantidad de (pro)MMP-9 en el sobrenadante de células LLC

Numerosas evidencias apoyan una relación entre VEGF y (pro)MMP-9 y un importante papel de ambas moléculas en la patología de la LLC [78, 179]. Además, los efectos del VEGF podrían ser diferentes dependiendo de su concentración, como ya se observó por ejemplo en el caso de la regulación de la migración celular por (pro)MMP-9 [40, 177]. Por ello, nos planteamos estudiar si VEGF, a diferentes concentraciones, regulaba la producción y la función de (pro)MMP-9 en LLC. Células LLC se incubaron con 20 o 200 ng/ml de la forma VEGF₁₆₅ la isoforma más comúnmente expresada por estas células) y tras 24 horas, el medio fue concentrado y analizado por zimografía. Como se puede observar en la Figura 54, el VEGF disminuía significativamente y de manera dosis dependiente, la cantidad de (pro)MMP-9 secretada por las células LLC.

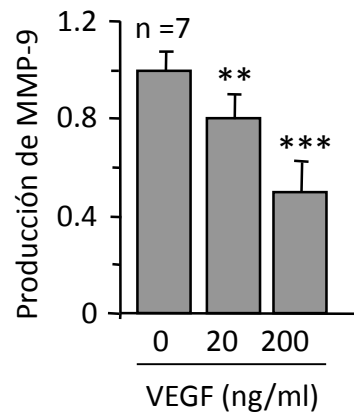
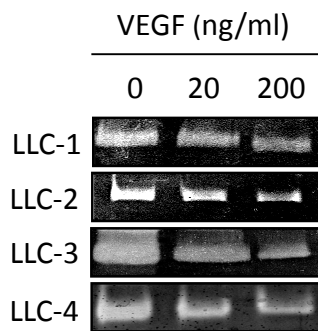


Figura 54. Altas concentraciones de VEGF inhiben la secreción de proMMP-9 al medio de células LLC: 2.5×10^6 células LLC fueron incubadas con 20 o 200 ng/ml de VEGF165 y tras 24 horas, el sobrenadante celular fue recogido, concentrado y analizado por zimografía para detectar la cantidad de proMMP-9 expresada. La disminución de la expresión de proMMP-9 fue significativa ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

La inhibición de la producción de (pro)MMP-9 por VEGF se produce a través del receptor VEGFR2

Dado que la isoforma VEGF165 es capaz de unirse tanto al receptor VEGFR1 como al VEGFR2, quisimos determinar cuál de estos dos receptores estaba implicado en el efecto producido por el VEGF. Con este fin, se preincubaron las células LLC con el factor de crecimiento de placenta (PlGF), el cual es capaz de unirse únicamente al receptor VEGFR1. Como se observa en la Figura 55, el sobrenadante de las células tratadas con PlGF contenía la misma cantidad de proMMP-9 que las células sin tratar, indicando la falta de señalización hacia proMMP-9 a través de este receptor. De acuerdo con esto, el bloqueo del receptor VEGFR2 por un inhibidor específico evitaba la bajada de la producción de proMMP-9 en respuesta a VEGF (Figura 55). Estos resultados demostraron que el receptor VEGFR2 era el implicado en la disminución de proMMP-9 por VEGF.

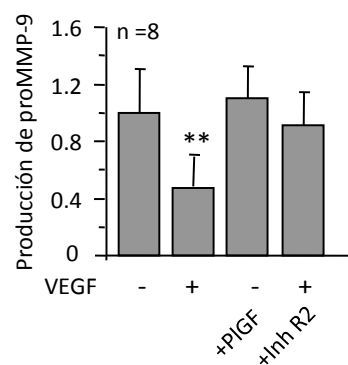
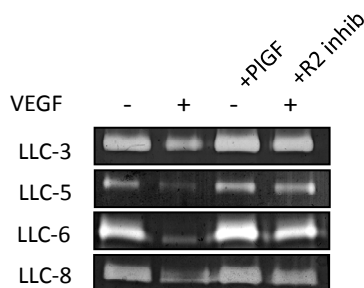


Figura 55. El receptor VEGFR2 es el implicado en el efecto del VEGF sobre la producción de proMMP9: 2.5×10^6 células fueron tratadas con las proteínas indicadas y, tras 24 horas, el sobrenadante celular fue recogido, concentrado y analizado por zimografía para detectar la cantidad de proMMP-9 expresada. La disminución de la expresión de proMMP-9 fue significativa ** $p < 0,01$.

La disminución de (pro)MMP-9 por niveles elevados de VEGF se traduce en una disminución de la migración celular

Dada la implicación de proMMP-9 en la migración de células LLC, estudiamos si la modulación de (pro)MMP-9 por VEGF afectaba la migración celular. En la Figura 56 se muestra la migración de células LLC a través de Matrigel y de células HUVEC. Como se puede observar la migración disminuía en ambos casos para células LLC tratadas con VEGF. También se trataron las células con PlGF o con el inhibidor de VEGFR2 y VEGF. La incubación con PlGF no afectó a la migración celular implicando de nuevo a VEGFR2 y no a VEGFR1 en este efecto. Consecuentemente, la incubación con el inhibidor de VEGFR2 y posterior estimulación con VEGF, revertía el efecto inhibitorio de la migración inducido por VEGFR2. En conjunto estos resultados indicaban que el eje VEGF/VEGFR2 era el implicado en la disminución de (pro)MMP-9 y la migración celular, en respuesta a VEGF

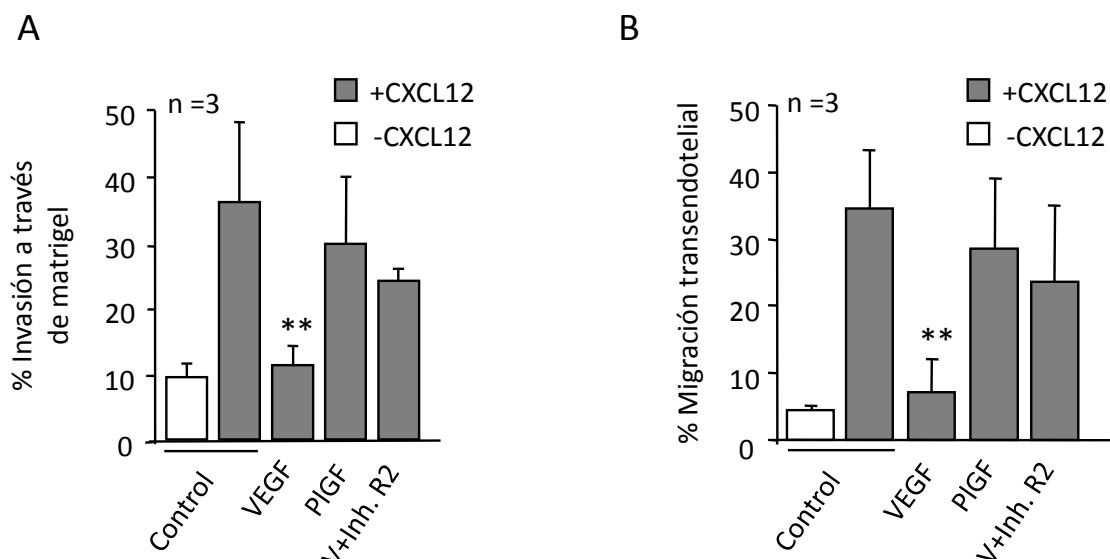


Figura 56. VEGF disminuye la migración de las células LLC inducida por CXCL12: Células de pacientes de LLC incubadas con VEGF, PlGF o el inhibidor de VEGFR2 más VEGF durante 30 minutos fueron sometidas a ensayos de invasión a través de Matrigel (A) y de migración transendotelial (B), en respuesta a la quimioquina CXCL12, Ambos procesos se inhibían de manera significativa tras incubación con VEGF. (**p<0,01).

El factor de transcripción STAT-1 es el implicado en el bloqueo de la síntesis de proMMP-9 por VEGF

Para determinar la ruta de señalización que daba lugar a la disminución de proMMP-9 por VEGF, en primer lugar se analizó si la regulación se producía a nivel transcripcional. Como se muestra en la Figura 57, los niveles de mRNA de proMMP-9 analizados por RT-PCR eran

menores en las células tratadas con VEGF durante 1 ó 3 horas que en células control no tratadas.

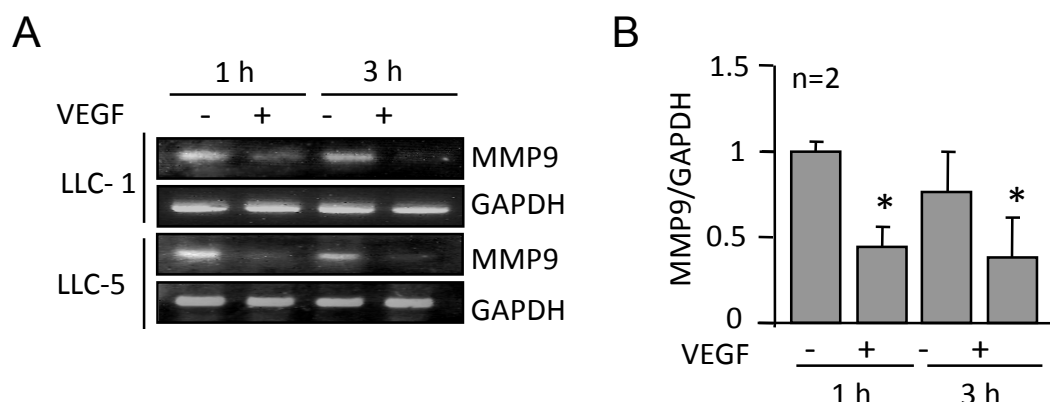


Figura 57. VEGF disminuye la expresión de proMMP-9 a nivel transcripcional: (A) 10×10^6 células LLC fueron preincubadas con VEGF durante 1 y 3 horas. Tras esta incubación, se analizaron los niveles de mRNA de proMMP-9 por RT-PCR. (B) La gráfica muestra las cuantificaciones obtenidas de las bandas de los geles de agarosa, después de normalizar a 1 el control de VEGF a 1 hora. La inhibición de la transcripción de proMMP-9 fue significativa * $p < 0.05$

Se ha demostrado que VEGFR2 es capaz de fosforilar en tirosina los factores de transcripción STAT1 y STAT6 en células bovinas de la aorta (15) Además, en células LLC la fosforilación de las serinas 727 de STAT1 y STAT3 juega un papel muy importante para la supervivencia celular (16). También se ha demostrado que STAT1 juega un papel esencial en la regulación de (pro)MMP-9 por interferones en numerosos sistemas celulares (17-19). Por ello, se pensó que STAT1 podría estar implicado en la disminución de la transcripción de la proMMP-9 en respuesta a VEGF. Con el fin de determinar esta implicación, se lisaron células LLC incubadas 30 minutos con VEGF y se analizó la fosforilación de STAT1. La Figura 58A muestra que la incubación con VEGF, pero no con PlGF, inducía la fosforilación de STAT1. Este efecto no se observaba al preincubar las células con el inhibidor VEGFR2.

STAT1 se caracteriza por la dimerización y posterior translocación al núcleo cuando es fosforilado. Con el fin de demostrar esta translocación en nuestro sistema, se realizaron ensayos de fraccionamiento núcleo-citoplasma. Como se muestra en la Figura 58B, la unión de VEGF a VEGFR2 provocaba la translocación de STAT1 fosforilado al núcleo, proceso necesario para que realice su función.

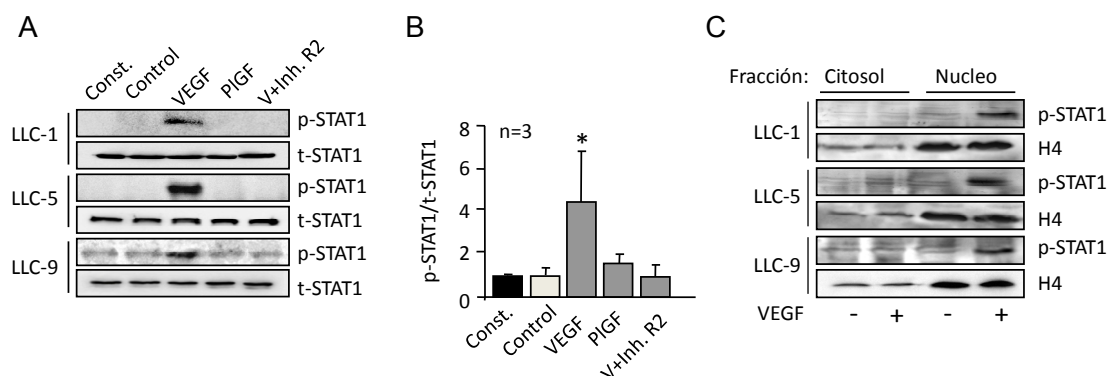


Figura 58. STAT1 es fosforilado y se transloca al núcleo tras tratar las células LLC con VEGF: (A) Células de LLC fueron preincubadas con las proteínas indicadas y tras 30 minutos se lisaron y analizaron por Western blot. (B) Cuantificación de las bandas obtenidas en el blot. La fosforilación de STAT1 por VEGF era significativa $*p < 0.05$. (C) Células de pacientes de LLC fueron preincubadas o no con VEGF durante 30 minutos y posteriormente se lisaron con las soluciones del protocolo de fraccionamiento núcleo-citoplasma. Los lisados correspondientes a las diferentes fracciones se analizaron por Western blot. Const.=Constitutivo.

Para establecer el papel crítico de STAT1 en la regulación de proMMP-9 por VEGF, en células LLC, se silenció este factor de transcripción con un siRNA específico. La Figura 59A muestra la eficiencia de este silenciamiento. El análisis por zimografía de la proMMP-9 secretada por estas células en respuesta a VEGF demostró que los niveles de proMMP-9 no variaban con respecto a las células control (Figura 59B). Se estudió también la migración de las células, y como se muestra en la Figura 59C, las células con STAT1 estaba silenciado migraron igual que las células control, revirtiéndose, por tanto, el efecto inhibitorio de la migración, inducido por VEGF. En todos los experimentos se utilizó un siRNA control para confirmar que el efecto observado era debido a la ausencia de STAT1 y no al proceso de transfección.

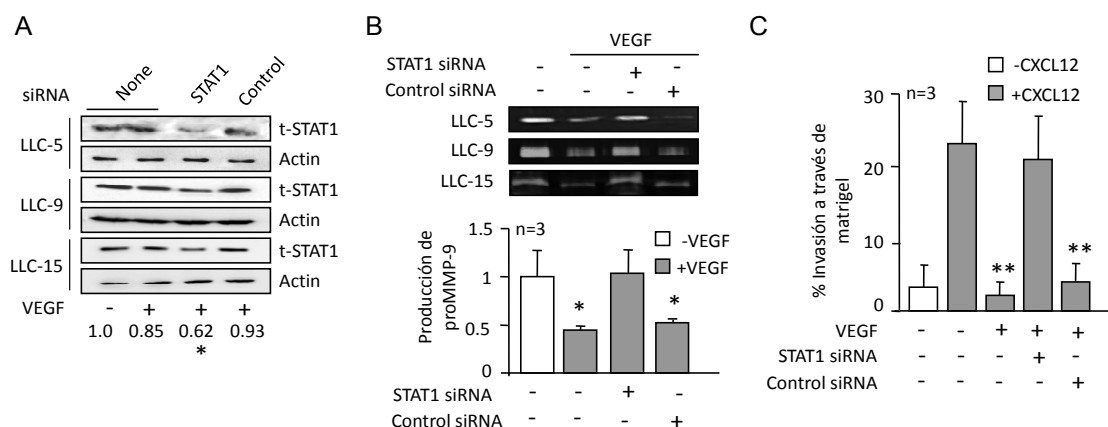
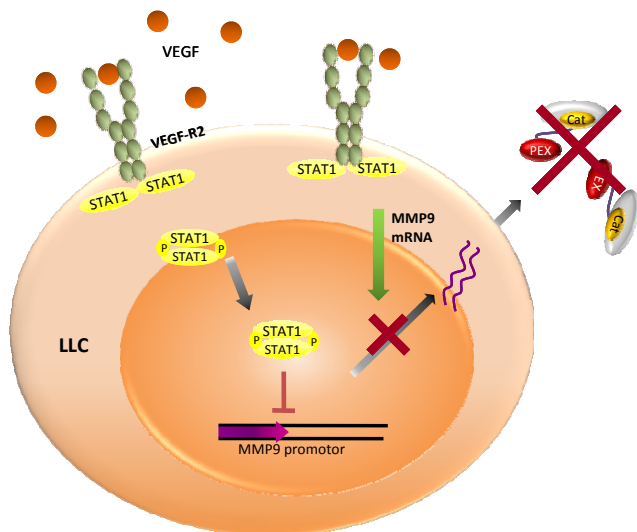


Figura 59. Análisis del silenciamiento de STAT-1: (A) Células LLC fueron transfectadas con siRNA de STAT1 o siRNA control y se analizó el silenciamiento del factor de transcripción por Western blot. El silenciamiento fue significativo $*p < 0.05$. (B) Las células silenciadas se cultivaron en presencia de VEGF y tras 24 horas se analizó por zimografía la proMMP-9 presente en el sobrenadante. (C) Las células silenciadas fueron sometidas a ensayos de invasión a través de Matrigel. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.



Todos estos experimentos demostraron que niveles elevados de VEGF inducen la fosforilación de STAT1 a través del receptor VEGFR2. Una vez que STAT1 está fosforilado se transloca al núcleo inhibiendo la transcripción de proMMP-9 (Figura 60).

Figura 60. Representación esquemática de la regulación de proMMP-9 por VEGF en células LLC.

REGULACIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS POR proMMP-9 EN CÉLULAS LLC

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PROMMP-9 Y VEGF POR PROMMP-9 Y GST-PEX9 EN CÉLULAS LLC

Una vez establecida la regulación de proMMP-9 por VEGF, estudiamos si proMMP-9 era capaz de regular VEGF tras su unión a células LLC. Esta regulación se había observado previamente en otros sistemas celulares [180-182]. Células LLC se cultivaron sobre proMMP-9 o GST-PEX9 y tras 6 horas se analizaron los niveles del mRNA de VEGF por PCR cuantitativa. Como se observa en la Figura 61 los niveles del mRNA de VEGF, aumentaron en células sobre proMMP-9 pero disminuyeron sobre células sobre GST-PEX9.

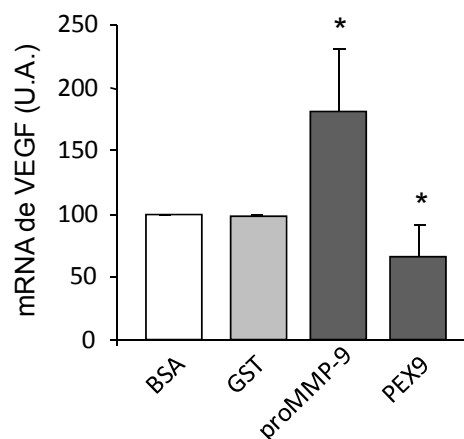


Figura 61. Regulación transcripcional VEGF tras el cultivo de células LLC sobre proMMP-9 GST-PEX9: Células LLC se cultivaron sobre proMMP-9 (120 nM), GST-PEX9 (0.2 µM) o GST (0.2 µM) y tras 6 horas se analizó los niveles de mRNA de VEGF por PCR cuantitativa. (U.A: Unidades Arbitrarias.)

Resultados previos en otros sistemas celulares han demostrado que PEX9 y PEX2 inhiben la angiogénesis, datos que corroboraban los resultados mostrados en la Figura 61. Analizamos por tanto la formación de tubos por células HUVEC, incubando, en primer lugar, estas células HUVEC con proMMP-9 o GST-PEX9, con el fin de estudiar el efecto directo de estas proteínas por separado en las células LLC. La Figura 62 muestra que GST-PEX9 inhibía la formación de tubos, mientras que proMMP-9 lo aumentaba, corroborando los datos obtenidos por otros grupos. Se analizó entonces el efecto de las células LLC, solas, o preincubadas con proMMP-9 o GST-PEX9, sobre la formación de tubos en cocultivos con células HUVEC. El cocultivo de células LLC, con células HUVEC resultaba en un aumento en la formación de tubos, cuando las células LLC eran preincubadas con proMMP-9. Sin embargo, la preincubación de células LLC con GST-PEX9 disminuía la vasculogénesis (Figura 62). Estos resultados refuerzan los datos obtenidos por PCR cuantitativa mostrando una regulación inversa de VEGF por proMMP-9 y GST-PEX9.

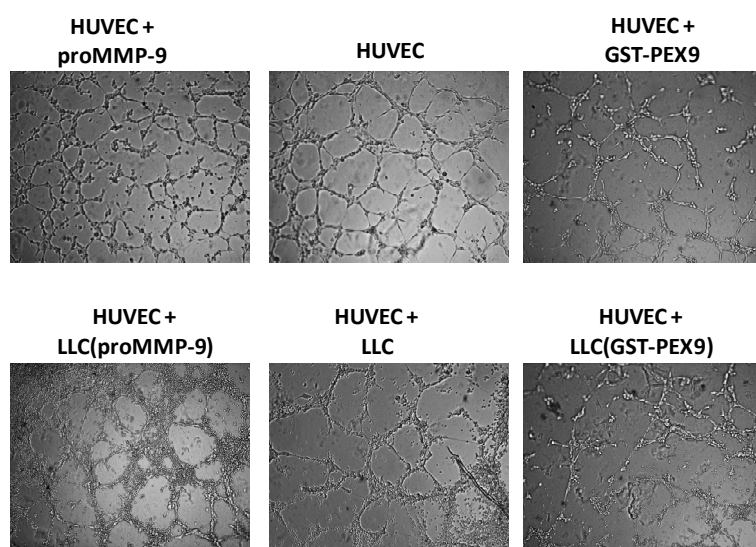


Figura 62 proMMP-9 aumenta la formación de tubos con células HUVEC y GST-PEX lo disminuye: (A) Células LLC se cultivaron sobre las proteínas indicadas, tras 24 horas se recogió el sobrenadante y se analizó por zimografía. El aumento de la expresión de proMMP-9 fue significativo $**p<0.01$. (B) Ensayos de formación de tubos con células HUVEC en presencia de las proteínas proMMP-9 (120nM) o GST-PEX9 (0.2 μ M) o células LLC solas o preincubadas con las proteínas indicadas. A las 6 horas se tomaron fotografías.

La integrina $\alpha 4\beta 1$ inmunoprecipita con VEGFR2 en células LLC

Dada la relación observada entre (pro)MMP-9 y VEGF, analizamos también si existía una asociación entre los receptores de ambas proteínas, la integrina $\alpha 4\beta 1$ (proMMP-9) y VEGFR2 (VEGF). Para ello se realizaron ensayos de coinmunoprecipitación de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 1$ de la integrina, CD14 (control negativo) y VEGF (control positivo) tanto en células primarias de LLC como en células MEC-1. La Figura 63 muestra que el receptor VEGFR2 coinmunoprecipitaba con ambas subunidades de la integrina $\alpha 4\beta 1$, y VEGF y no con CD14 el control negativo (Figura 63A)

Para confirmar estos datos, se analizó por microscopía confocal la localización de VEGFR2 con $\alpha 4\beta 1$ y VEGF. La Figura 63C muestra que aunque no existe una colocalización total de ambas proteínas sí se pueden observar zonas en que ambos receptores parecen estar asociados.

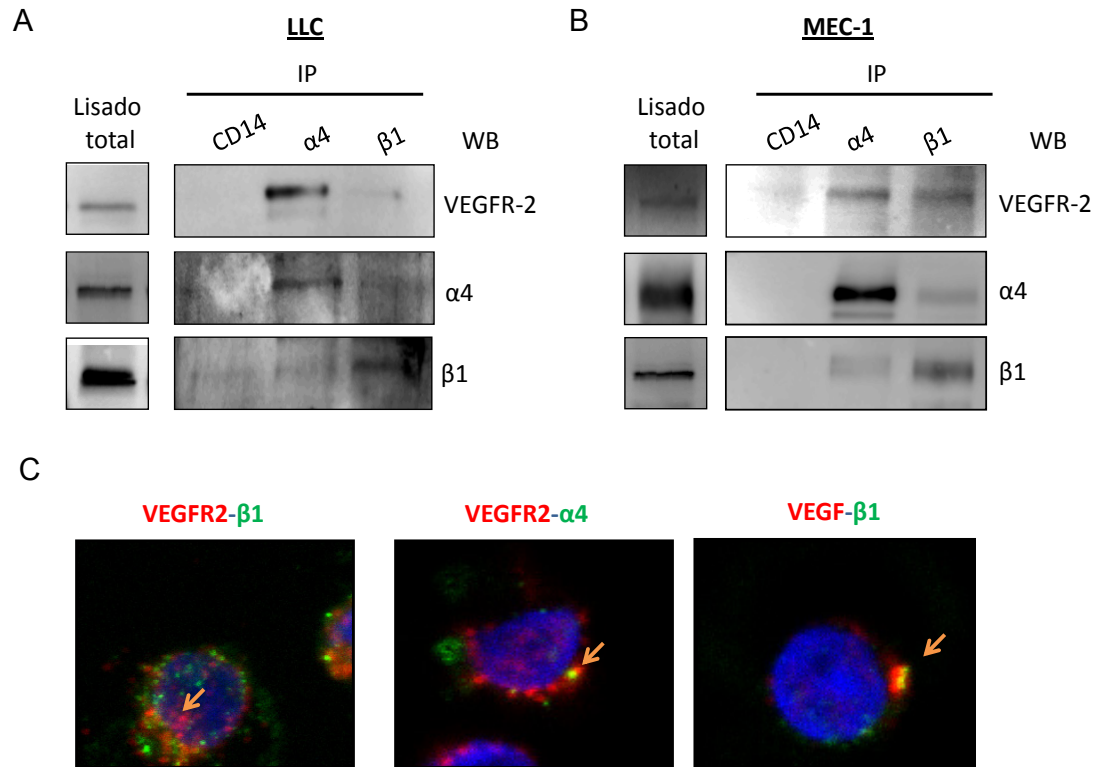


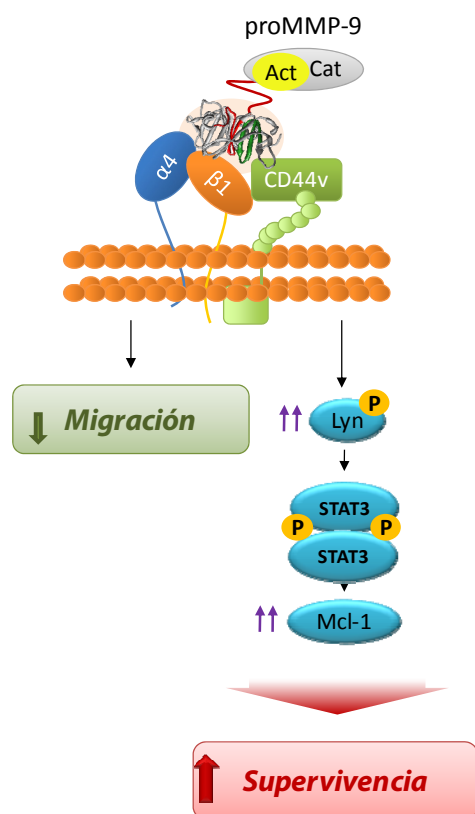
Figura 63: Posible asociación de $\alpha 4\beta 1$, VEGFR2 y VEGF en la membrana células de LLC: (A y B) Lisados de células primarias LLC (A) y de células MEC-1(B) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti- $\alpha 4$, anti- $\beta 1$, anti-VEGF y anti-CD14 (control negativo). El *Western blot* fue realizado con los anticuerpos indicados. (C) Análisis mediante microscopía confocal de la colocalización de $\alpha 4$, $\beta 1$, VEGFR2 y VEGF. En rojo aparecen VEGFR2 o VEGF, en verde $\alpha 4$ y $\beta 1$ y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Las imágenes muestran la superposición de los tres colores.

DISCUSIÓN

La progresión de la LLC está determinada por la progresiva infiltración y acumulación de células malignas en médula ósea y órganos linfoides secundarios. En estos procesos de migración están implicadas numerosas moléculas como la integrina $\alpha 4\beta 1$, quimioquinas y MMPs [171]. La MMP expresada mayoritariamente en la LLC es la MMP-9, cuyos altos niveles en suero correlacionan además con un mal pronóstico de la LLC [173]. Resultados anteriores del laboratorio han demostrado que la (pro)MMP-9 contribuye no sólo a la expansión de las células tumorales sino también a su supervivencia [40], estableciendo (corroborando) por tanto su importante papel en la patogénesis de la LLC. Por ello, el principal objetivo de esta tesis doctoral ha sido profundizar en el estudio de la unión de MMP-9 a células LLC y analizar sus consecuencias funcionales, así como de la regulación de MMP-9 por factores relevantes en la LLC.

Estudios anteriores del laboratorio y de otros grupos han demostrado la presencia de MMP-9 en la superficie de células LLC, a pesar de que MMP-9 carece de región transmembrana [102, 173, 183]. Nos propusimos caracterizar esta unión y para ello se realizaron inmunoprecipitaciones, fraccionamientos núcleo-citoplasma y microscopia confocal. Los resultados demostraron que MMP-9 se une a un complejo en la superficie celular formado

por la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v, una isoforma de CD44 de 190 kDa. La capacidad de unir MMP-9 es una característica de células LLC, ya que en resultados no mostrados, MMP-9 no se une a linfocitos B normales ni derivados de linfoma de manto [172]. Hay que destacar que la elevada expresión de $\alpha 4\beta 1$ y CD44v en las células LLC (que se traduce en una mayor unión de MMP-9 [184] correlaciona con un mal pronóstico de la enfermedad [95]. La posible especificidad de CD44v como receptor de MMP-9 podría ser otra característica de la LLC, ya que en otros sistemas celulares MMP-9 interacciona con la forma estándar CD44H de 90 kDa [113, 185, 186]. Además se ha observado que diferentes isoformas de CD44v están implicadas en diferentes tipos de cáncer en la unión de MMP-9 [187, 188].



Nuestros datos han demostrado que la asociación de MMP-9 a células LLC se traduce en al menos dos consecuencias funcionales importantes: 1) inhibición de la migración transendotelial, y 2) aumento de la supervivencia celular *in vitro*. Estas funciones son especialmente relevantes en los nichos de células LLC. En estos nichos las células LLC reciben señales de supervivencia y proliferación a través de los factores presentes en ellos, como la MMP-9, que es expresada y secretada tanto por las propias células LLC como por otras células de su microambiente. Además, estos nichos también proporcionan señales que aumentan la producción de MMP-9, (a través de quimioquinas o/y de interacciones de células LLC con ligandos de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y su asociación a la membrana de células LLC, como de hecho hemos demostrado previamente [172, 174]. La mayor presencia de MMP-9 inhibiría por tanto la migración celular, favoreciendo su permanencia en los nichos y su supervivencia. La unión de MMP-9 a células LLC contribuye por tanto a la progresión de la enfermedad y el bloqueo de esta unión podría constituir una buena diana terapéutica [40, 177]. Por ello, una gran parte del trabajo de esta tesis doctoral se ha dedicado a caracterizar el/los dominio(s) de MMP-9 implicados en su interacción con células LLC y al estudio de las consecuencias de su bloqueo.

La utilización de proMMP-9 recombinantes con delecciones de diferentes dominios nos ha permitido demostrar que el dominio hemopexina (PEX9) era esencial para el anclaje de proMMP-9 a la superficie de células LLC. Estos datos apoyan resultados previos en otros sistemas, que confirman el papel fundamental del dominio hemopexina de las MMPs en la interacción con otras proteínas y con células [136, 189, 190]. De hecho, el dominio hemopexina de la MMP-9 puede constituir una diana terapéutica específica, dada la baja homología existente entre el PEX9 y el resto de los PEX de otras MMPs. Así, el PEX9 tiene un 25-33% de homología con los dominios PEX de otras MMPs [114, 136]. Además, la secuencia de aminoácidos del PEX9 no presenta ninguna de las secuencias activas identificadas en otros ligandos de la integrina $\alpha 4\beta 1$ [191, 192]. Todo ello confirmaba la importancia de estudiar las propiedades del dominio PEX9 aislado. Nuestros resultados muestran que la proteína de fusión GST-PEX9 se une de manera eficiente y específica tanto a células LLC primarias como a células MEC-1. Esta unión es mediada fundamentalmente por la integrina $\alpha 4\beta 1$, demostrado con inhibidores específicos de esta integrina y con células K562 que expresaban o no $\alpha 4\beta 1$. La preferente utilización de $\alpha 4\beta 1$ como receptor de PEX9 contrasta con lo observado en la interacción celular con proMMP-9, donde tanto $\alpha 4\beta 1$ como CD44v estaban implicados [177]. De hecho, está bastante establecido que CD44 es un receptor para proMMP-9 en otros tipos

celulares [113, 185, 186]. La interacción con uno o ambos receptores podría depender de la conformación que adoptara el PEX9 aislado o cuando está en la molécula de proMMP-9 completa. En este sentido, proMMP-9 es una molécula bastante flexible debido a la presencia del dominio O-Glucosídico (OG) [136]. Otra posible razón que explicara la diferente implicación de receptores celulares podría ser que la afinidad de la interacción proMMP-9-CD44 varíe en función de las moléculas a las que pueda estar asociado CD44 en la superficie celular.

Nuestros resultados muestran que GST-PEX9, al igual que la proMMP-9 completa, inhibe la migración de células LLC tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que aumenta la relevancia de esta función de PEX9 [193]. Estos datos concuerdan con estudios previos en los que tanto el dominio PEX9 murino como el dominio hemopexina de la MMP-2 (dominio PEX2) inhibían la migración de varios tipos celulares [163, 164, 169]. Esta actividad biológica del dominio PEX de las MMPs puede ser especialmente relevante, ya que se ha detectado PEX2 circulante *in vivo* y se puede generar *in vitro* tras la activación de proMMP-2 con APMA. No se conoce si PEX9 aislado está presente de forma natural en la LLC, pero recientemente se han encontrado formas truncadas de MMP-9 que contienen el dominio PEX9, en el medio condicionado de células de cáncer de mama [194]. También se ha generado estas formas *in vitro* por tratamiento con peptidasa-7 [194], por lo que no se puede descartar que PEX9 pueda generarse de forma natural en la LLC, bajo determinados estímulos.

El mecanismo exacto por el que PEX9 inhibe la migración de células LLC aún no se conoce. Dado que PEX9 es un ligando de $\alpha 4\beta 1$, el efecto inhibitorio puede deberse al bloqueo de esta integrina por la unión de PEX9, ya que se ha demostrado previamente que $\alpha 4\beta 1$ es esencial para la migración de células LLC [81]. Además (o alternativamente) es posible que la unión de PEX9 a $\alpha 4\beta 1$ genere una señalización intracelular, que dé lugar a la inhibición de proteínas de la familia Rho, como hemos demostrado recientemente en células MEC-1 que sobreexpresan MMP-9 [184].

La unión de GST-PEX9 a células LLC induce además señales de supervivencia celular, como fosforilación de Lyn y aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Este efecto reproduce por tanto la señalización observada previamente tras la interacción de proMMP-9 con sus receptores celulares [40, 177]. Nuestros datos establecen por tanto el importante papel del dominio PEX9 en la contribución de MMP-9 a la progresión de la LLC y fundamentan el hecho de que la actividad catalítica de MMP-9 no es necesaria para al menos, algunos de sus efectos funcionales.

Para la identificación de los sitios de PEX9 responsables de la unión a sus receptores celulares, nos hemos basado en el hecho de que PEX9 contiene 4 subdominios estructurales bien definidos (D1-D4) [130]. Ello ha permitido generar dos proteínas de fusión con GST, conteniendo cada una dos de estos subdominios y estudiar sus propiedades por separado. Ambas proteínas, GST-D1D2 y GST-D3D4 eran igualmente eficientes en mediar y bloquear la migración celular [195]. Sin embargo, nuestros resultados han establecido que GST-D1D2 interacciona fundamentalmente con CD44 mientras que la integrina $\alpha 4\beta 1$ es el principal receptor de GST-D3D4 [193, 195]. Estos datos corroboran el papel del CD44 como parte del complejo de unión de la proMMP-9 a células LLC descrito previamente [177], establecido también en otros sistemas celulares [167].

El reconocimiento de GST-D1D2 por CD44 contrasta con el pequeño efecto, ya mencionado, del bloqueo de CD44 por anticuerpos o siRNA en la adhesión celular a GST-PEX9. [193]. Una posible explicación para estos resultados podría ser que el sitio de unión de D1D2 a CD44 estuviera críptico o enmascarado en el dominio PEX9 completo. Una explicación alternativa es que la interacción de PEX9 con $\alpha 4\beta 1$ es de mayor afinidad que con CD44. En apoyo de esta explicación, la proteína GST-D1D2 en forma soluble no se une (o lo hace muy débilmente) a células LLC mientras que GST-D3D4 se une eficientemente. Adicionalmente, la heterogeneidad de expresión de CD44v entre las diferentes muestras de LLC podría contribuir a su capacidad de reconocimiento de PEX9 [95].

(pro)MMP-9 interacciona con varias integrinas en diferentes sistemas celulares y trabajos previos han abordado el bloqueo de estas interacciones. Por ejemplo, usando la metodología de *phage display* se ha descrito que la secuencia DELW, presente en el dominio catalítico de la MMP-9 (y MMP-2), bloquea la unión de estas MMPs a las integrinas $\alpha \beta 2$ y $\alpha \beta 5$ en células monocíticas THP1 [196]. También, se ha demostrado que el péptido HFDDDE, también en el dominio catalítico, inhibe la extravasación celular *in vivo* en un modelo de xenotransplante de leucemia mieloide aguda [197]. Los mismos autores han publicado que péptidos que contienen el motivo CRV, que mimetiza un epítipo de activación de las integrinas, inhiben la unión de MMP-9 a la subunidad β de la integrina $\alpha \beta 5$ en células de fibrosarcoma [198].

En esta tesis se ha utilizado una aproximación diferente para definir la(s) secuencia(s) específica(s) del dominio PEX9 implicadas en la unión a células LLC. Usando en primer lugar una serie de péptidos sintéticos solapantes que abarcaban la región D3D4 hemos identificado la secuencia FPGVPLDTHDVFQYREKAYFC dentro de D4, como un nuevo sitio de unión para la

integrina $\alpha 4\beta 1$. El péptido sintético P3, que contiene esta secuencia, y los péptidos más cortos derivados de P3, P3a y P3b, inhiben eficazmente la migración transendotelial de células LLC y la unión de GST-PEX9 soluble a estas células. También inhiben parcialmente la adhesión a GST-PEX9 y a proMMP-9, lo que sugiere la existencia de otros sitios de unión en PEX9, como nuestros resultados también demuestran (ver a continuación). Otra propiedad importante de los péptidos P3 y derivados es su capacidad para inhibir por completo la señalización de supervivencia inducida por el cultivo de células LLC sobre proMMP-9 o GST-PEX9.

Nuestros datos aportan además evidencias adicionales que confirman la especificidad de la secuencia FPGVPLDTHDVFQYREKAYFC y su función de ligando de la integrina $\alpha 4\beta 1$. En primer lugar el efecto funcional de un anticuerpo generado frente al péptido P3, que inhibe la adhesión y migración de células LLC [193]. En segundo lugar, el hecho de que mutando los dos residuos de aspártico (Asp-660 y Asp-663) presentes en P3 se bloquea el efecto inhibitorio de este péptido. Se ha demostrado que los residuos de aspártico son claves para el reconocimiento y unión de ligandos a muchas integrinas, incluyendo $\alpha 4\beta 1$ [191, 192]. Otro dato que apoya la especificidad de la secuencia P3 como ligando de $\alpha 4\beta 1$ es la homología entre el motivo LDT, presente en P3, y motivos conocidos de unión a esta integrina como LDV y LDA, presentes en las regiones de fibronectina CS1 y dominio III5, respectivamente, o la secuencia IDS de VCAM-1 [192, 199, 200]. Es importante destacar que, a pesar de la similitud de estos motivos, el péptido P3 sólo inhibe la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con GST-PEX9 o proMMP-9 sin afectar a otros ligandos de esta integrina, como VCAM-1 o FN-H89 [193]. En este sentido, los cálculos de la KD y el IC50 indican que la unión de P3 a $\alpha 4\beta 1$ es de baja afinidad y esto puede representar una ventaja para bloquear específicamente la interacción $\alpha 4\beta 1$ -MMP-9, presumiblemente también de baja afinidad.

Hemos estudiado también los posibles sitios activos presentes en la región D1D2 de PEX9. Esta región también mediaba adhesión celular eficientemente. Siguiendo una aproximación similar, con péptidos sintéticos solapantes que abarcaban esta región, nuestros resultados demuestran que la secuencia FDAIAEIGNQLYLFKDGKYW (péptido P6) es un nuevo sitio de unión celular al dominio PEX9. Al igual que P3, P6 inhibe eficientemente la migración celular y parcialmente la adhesión a GST-PEX9 [195]. Además, P6 inhibe también la adhesión celular a ácido hialurónico, ligando natural de CD44, confirmando la interacción de P6 con este receptor.

Dufour et al. demostraron que un péptido sintético conteniendo la secuencia SRPQGPFL, presente en la lámina β del subdominio 1 de PEX9, inhibía la interacción CD44-

MMP-9 en células COS-1 y la migración de células de carcinoma [167]. En el estudio realizado en esta tesis doctoral esta secuencia se encuentra en el péptido P7, que también inhibe parcialmente la adhesión de células LLC a GST-PEX9. Sin embargo, existen varias diferencias entre los péptidos P7 y P6: P7 es peor inhibidor de la adhesión a GST-PEX9 que P6 y apenas bloquea la adhesión a ácido hialurónico. Estos resultados no contradicen el trabajo de Dufour, pero revelan la existencia de una nueva secuencia en el subdominio 1 de PEX9, que se une más eficientemente a células LLC que la secuencia SRPQGPFL. Dado que la actividad de P6 no se ha testado en el sistema de Dufour, ni tampoco en otros sistemas celulares, no se puede descartar que este péptido inhiba también la adhesión y migración en otros tipos celulares.

Otra diferencia entre los péptidos P6 y P7 es su disposición espacial dentro de PEX9. Mientras que P7 se encuentra en la parte externa de la molécula, en concreto en la cadena β -laminar, P6 está dentro de la cavidad central. La localización central de P6 es similar a la del péptido P3, ligando de la integrina $\alpha 4\beta 1$ situado en el subdominio 4 de PEX9 [193]. En apoyo de nuestros datos, trabajos recientes, que han utilizado aproximaciones *in silico*, han identificado pequeñas moléculas que se unen a la cavidad central de PEX9 y del dominio hemopexina de la MMP-14 e inhiben la migración, proliferación y metástasis de células de carcinoma [170, 201]. La cavidad central del dominio PEX9 parece ser por tanto esencial para la unión de las MMPs a las células y puede constituir una buena diana terapéutica. De acuerdo con la proximidad espacial de P6 y P3 nuestros resultados demuestran que ambos péptidos cooperan sinérgicamente en la inhibición de la adhesión y la migración celular. El hecho de que el P7 no muestre esta cooperación con P3, confirma que P6 es la secuencia más activa del subdominio 1 de PEX9 y que coopera específicamente con la secuencia P3 asegurando así una mayor actividad inhibitoria.

Nuestro estudio muestra por tanto que la unión del dominio PEX9 a células CLL implica la interacción cooperativa de la secuencia P6 (subdominio 1) con CD44 y P3 (subdominio 4) con la integrina $\alpha 4\beta 1$. Numerosos estudios, incluidos los de nuestro laboratorio, han demostrado la importancia de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la migración, tanto *in vivo* como *in vitro*, y supervivencia de células de LLC [40, 72, 202], por lo que los datos obtenidos en este trabajo corroboran el papel de $\alpha 4\beta 1$ en la progresión de la enfermedad.

El papel de CD44 en la LLC ha sido menos estudiado, aunque en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios que indican que CD44 también contribuye al progreso de la LLC. Nuestro grupo ha demostrado que la inhibición de CD44 bloquea la unión de proMMP-9 a células LLC y por tanto la subsiguiente señalización de supervivencia [40]. Otros

trabajos han analizado la interacción de CD44 con ácido hialurónico o proMMP-9 y observado que regula la migración de células de carcinoma [203]. La interacción CD44-hialurónico inhibe también la apoptosis espontánea y en respuesta a drogas de células CLL [167, 204, 205]. También se ha publicado un estudio reciente que demuestra la citotoxicidad de un anticuerpo monoclonal anti-CD44 en células LLC, y su capacidad para revertir el injerto de células de leucemia en modelos de ratón [206]. Todos estos datos remarcan la importancia de CD44 en diferentes patologías y en concreto en la LLC, por lo que podría ser relevante la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos contra esta molécula.

Del conjunto de nuestros datos se deduce que el dominio PEX9 puede constituir una diana terapéutica buena y específica para generar nuevas drogas que frenen la progresión de la LLC. De hecho, el análisis por BLAST revela, que a diferencia de otras secuencias que se

encuentran en el dominio catalítico de la proMMP-9, las secuencias de los subdominios 4 y 1 de PEX9 no presentan ningún tipo de homología con secuencias de otras MMPs. Por otro lado, y muy importante, los péptidos P3 y P6 son capaces de inhibir la migración en todos los casos de LLC estudiados, independientemente del estadio clínico de las muestras analizadas. Todo ello indica que las secuencias identificadas, PGVPLDTHDVFQYREKAYFC (P3) y FDAIAEIGNQLYLKDGKYW (P6) podrían ser unas dianas excelentes para bloquear la asociación celular de proMMP-9 y los posteriores eventos que contribuyen a la patogénesis de la LLC.

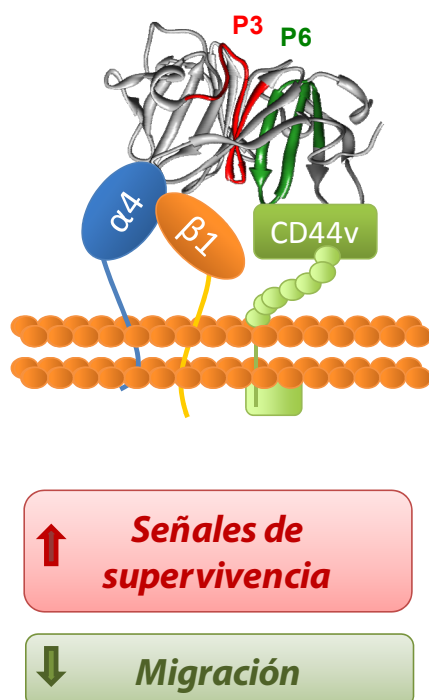
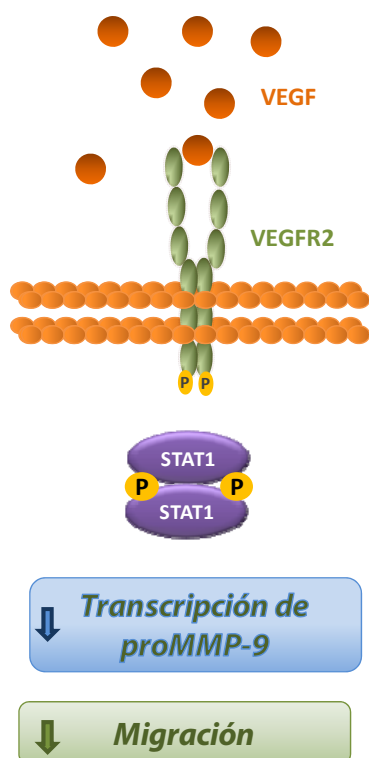


Figura:

Aunque la (pro)MMP-9 constitutiva es necesaria para la migración de células de LLC, resultados de nuestro grupo han demostrado que niveles elevados de (pro)MMP-9, sobre todo en la membrana celular, inhiben la migración tanto *in vitro* como *in vivo* [177, 184]. Esto sugería que (pro)MMP-9 podría tener diferentes efectos dependiendo de las concentraciones presentes localmente, pudiendo inducir por tanto migración o arresto celular. Por ello en esta tesis hemos estudiado también la posible regulación de la expresión de (pro)MMP-9 por otras moléculas relevantes para la LLC, como el VEGF.

VEGF también está implicada en la migración y supervivencia de células LLC y, al igual que la (pro)MMP-9, es producida por células LLC y abundante en su microambiente, ya que sus niveles aumentan en respuesta a varios estímulos fisiológicos [1, 45, 46] Además, se ha descrito previamente que anticuerpos anti-VEGF disminuían la expresión de MMP-9 en células LLC, sugiriendo una relación entre ambas proteínas [171]. Nuestros resultados demuestran



que altas concentraciones de VEGF inducían una disminución de la expresión de proMMP-9 y que este efecto era mediado por el receptor VEGFR2. La regulación negativa de (pro)MMP-9 por VEGF resultaba además en un bloqueo de la migración celular, confirmando el papel fundamental de (pro)MMP-9 constitutiva en este proceso [207]. No se conoce si niveles elevados de VEGF producirían el mismo efecto en (pro)MMP-9 y migración celular en otros tipos celulares. Nuestros datos muestran además que la regulación de (pro)MMP-9 por VEGF era a nivel transcripcional y que el factor de transcripción STAT-1 era crítico para esta señalización. Esto concuerda con el ya observado papel de los factores STAT en la regulación de la MMP-9 en otros sistemas celulares y la implicación de VEGFR2 [51, 208]. De hecho, VEGFR2 fosforila a STAT1 y STAT6 en células endoteliales de aorta bovina [208]. En LLC

VEGFR2 interacciona con STAT1 y STAT3 constitutivamente fosforilados en Ser727, produciendo un aumento de la supervivencia celular [51]. Además, STAT1 juega un papel esencial en la represión de la transcripción del gen de la proMMP-9 en respuesta a interferones en varios sistemas celulares [209-211]. De hecho, un estudio anterior demostró que los interferones inhiben la producción de proMMP-9 en células LLC, aunque no se abordó el mecanismo implicado [171]. A la vista de nuestros resultados, es bastante probable que STAT1 esté también implicado en la disminución de proMMP-9 en LLC en respuesta a interferones.

Otras evidencias apoyan un papel relevante de VEGF en la patogénesis de la LLC. Se ha observado que la angiogénesis está aumentada en la médula ósea de los pacientes de LLC [61] y que los niveles de VEGF en la orina y en el suero de estos pacientes son mayores que en individuos sanos, correlacionando con un mal pronóstico de la enfermedad [212, 213].

Como se ha mencionado, el VEGF autocrino aumenta la supervivencia de células LLC, ya que media el efecto antiapoptótico de CD154 (ligando de CD40) [68] y regula positivamente la expresión de numerosos genes antiapoptóticos [51]. Nuestros datos revelan un nuevo papel para VEGF en células LLC, que da lugar al bloqueo de la migración. El hecho de que el VEGF constitutivo no producía este efecto indicaba que requería concentraciones elevadas de VEGF, como las que probablemente se encuentran en los nichos de LLC, donde existen numerosos estímulos (hipoxia, CD154, células estromales) que aumentan la expresión de VEGF [66, 68]. Los niveles elevados de VEGF en estos nichos contribuirían a la acumulación de células malignas y la progresión de la enfermedad [61].

Una posible explicación para los diferentes efectos del VEGF a altas o bajas concentraciones, sería la inducción de diferentes respuestas tras su unión a VEGFR2. Por otra parte, este receptor se puede agrupar formando homodímeros o heterodímeros [214], o formar complejos con otros receptores de membrana como proteínas G [215]. La diferente composición de estos complejos podría generar diferentes respuestas ante un mismo estímulo. Alternativamente, altas concentraciones de VEGF podrían dar lugar a diferentes asociaciones entre receptores lo que resultaría también en diferentes señales intracelulares.

Debido a la similitud de funciones entre VEGF y proMMP-9 en LLC hemos estudiado también la posible asociación entre los receptores de ambas proteínas. En este sentido, un trabajo reciente ha demostrado una asociación entre la integrina $\alpha 4\beta 1$, proMMP-9, CD44 y CD38, en la membrana de células de LLC en correlación con un mal pronóstico [216]. En nuestro estudio, la integrina $\alpha 4\beta 1$ coinmunoprecipita con VEGFR2, tanto en células LLC primarias como en la línea celular MEC-1, y esta asociación se detecta también por microscopia confocal. Aunque estos resultados sugieren que esta asociación existe y que podría tener consecuencias funcionales importantes, son necesarios más estudios para determinar si $\alpha 4\beta 1$ y VEGFR2 pueden formar complejos en células LLC.

En otros tipos celulares se ha descrito que proMMP-9 induce la expresión de VEGF [180, 182]. Por ello, en esta tesis doctoral hemos analizado también la posible regulación de VEGF en células LLC, en respuesta a proMMP-9 y GST-PEX9. Nuestros resultados indican que proMMP-9 aumenta la transcripción de VEGF y la formación de vasos en cocultivos con células HUVEC, mientras que el dominio PEX9 inhibe ambos procesos. Esto podría sugerir que la actividad catalítica de la MMP-9 y no su mera unión a la membrana es necesaria para activar la transcripción del gen de VEGF. El hecho de que GST-PEX9 inhiba esta transcripción está de acuerdo con lo observado en otros sistemas celulares, en los que el dominio hemopexina de

MMP-2 o MMP-9, inhibían procesos angiogénicos [189, 217]. El mecanismo por el cual el dominio PEX9 inhibe la expresión y función de VEGF aún no se conoce.

Además de regular VEGF y angiogénesis, el dominio PEX9 también inhibía el crecimiento de tumores generados por células MEC-1 en ratones inmunodeprimidos. Estos resultados están de acuerdo con un trabajo anterior en el que el dominio PEX2 inhibía el crecimiento del tumores de glioblastoma [217]. Una posible explicación para la actividad de PEX9 sería que este dominio bloquea la unión de $\alpha 4\beta 1$ a otros de sus ligandos, o a otras estructuras **de la matriz extracelular**, que estabilizan el crecimiento del tumor. Además, la inhibición de la angiogénesis inducida por PEX9 bloquearía la llegada de nutrientes a las células tumorales, inhibiendo también su crecimiento. En resumen, nuestro estudio proporciona nuevos datos referentes a la unión de (pro)MMP-9 a células LLC y sus consecuencias patogénicas. También revela una nueva asociación funcional entre proMMP-9 y VEGF, dos moléculas fundamentales para la progresión de la LLC.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. proMMP-9 se une a células LLC a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v. Esta unión requiere la presencia del dominio hemopexina (PEX9) y resulta en una inhibición de la migración y un aumento de la supervivencia celular, contribuyendo por tanto a la patogénesis de la enfermedad.
2. El dominio PEX9 aislado es capaz de unirse a células LLC, inhibir la migración celular *in vitro* e *in vivo* e inducir señales intracelulares de supervivencia.
3. La interacción de PEX9 con células LLC implica también dos receptores diferentes: la integrina $\alpha 4\beta 1$ que reconoce los subdominios D3D4, y CD44 que se une a los subdominios D1D2.
4. La secuencia **FPGVPLDTHDVFQYREKAYF** del subdominio D4, contenida en el péptido P3, bloquea la interacción proMMP-9- $\alpha 4\beta 1$ y sus consecuencias funcionales. Inhibe además la migración celular.
5. La secuencia **FDAIAEIGNQLYLFKDGKYW** del subdominio D1, contenida en el péptido P6, bloquea la interacción proMMP-9-CD44, inhibiendo también la migración celular.
6. La combinación de los péptidos P3 y P6 tiene un efecto sinérgico en la inhibición de la adhesión y migración celular. Ambas secuencias podrían constituir buenas dianas para prevenir la unión de proMMP-9 a células LLC y su contribución a la progresión de la enfermedad.
7. Tanto PEX9 como un anticuerpo anti-P3 inhiben el crecimiento de tumores LCC subcutáneos en modelos de xenotransplante con células MEC-1.
8. La interacción de VEGF con su receptor VEGFR2 en células LLC disminuye la expresión de proMMP-9 y la migración celular. La regulación de proMMP-9 es a nivel transcripcional e implica la fosforilación de STAT1 en Tyr70.
9. La incubación de células LLC con proMMP-9 induce un aumento transcripcional de la expresión de VEGF y de la vasculogénesis en ensayos sobre células HUVEC.

-
10. Por el contrario, el cultivo de células LLC sobre PEX9 disminuye la expresión de VEGF y la vasculogenesis. Esto podría sugerir que es necesaria la actividad catalítica de la proMMP-9 para la regulación de VEGF o que PEX9 inhibe la acción de proMMP-9.
 11. Los receptores de proMMP-9 (integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v) y VEGF (VEGFR2) parecen estar asociados en la membrana de células LLC, lo que podría traducirse en una señalización intracelular común o complementaria.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 804-15.
2. Catovsky, D., J. Fooks, and S. Richards, *Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial*. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. Br J Haematol, 1989. **72**(2): p. 141-9.
3. Kay, N.E., et al., *Chronic lymphocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002: p. 193-213.
4. Abbott, B.L., *Advances in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Hematol Oncol, 2005. **23**(1): p. 34-40.
5. Linet, M.S., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis*. Br J Haematol, 2007. **139**(5): p. 672-86.
6. Caligaris-Cappio, F. and P. Ghia, *Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease?* J Clin Oncol, 2008. **26**(27): p. 4497-503.
7. Hamblin, T.J. and D.G. Oscier, *Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell*. Blood Rev, 1997. **11**(3): p. 119-28.
8. Caligaris-Cappio, F. and T.J. Hamblin, *B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather*. J Clin Oncol, 1999. **17**(1): p. 399-408.
9. Catovsky, D. and R.L. Murphy, *Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (CLL)*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(13-14): p. 2146-54.
10. Dighiero, G., et al., *B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions*. French Cooperative Group on CLL. Blood, 1991. **78**(8): p. 1901-14.
11. Rai, K.R. and A. Sawitsky, *A review of the prognostic role of cytogenetic, phenotypic, morphologic, and immune function characteristics in chronic lymphocytic leukemia*. Blood Cells, 1987. **12**(2): p. 327-38.
12. Binet, J.L., *[The lymphocytes of chronic lymphoid leukemia. Diagnostic, physiologic and prognostic significance]*. Bull Acad Natl Med, 1989. **173**(1): p. 73-6; discussion 77.
13. Chiorazzi, N., S.L. Allen, and M. Ferrarini, *Clinical and laboratory parameters that define clinically relevant B-CLL subgroups*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **294**: p. 109-33.
14. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, *Evolving view of the in-vivo kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 273-8, 512.

-
15. Nuckel, H., et al., *High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia*. Clin Immunol, 2009.
 16. Pittner, B.T., et al., *CD38 expression levels in chronic lymphocytic leukemia B cells are associated with activation marker expression and differential responses to interferon stimulation*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2264-72.
 17. Molica, S., et al., *Increased serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Eur J Haematol, 2003. **70**(6): p. 373-8.
 18. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, *Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities*. Blood. **117**(6): p. 1781-91.
 19. Seifert, M., et al., *Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med. **209**(12): p. 2183-98.
 20. Barragan, M., et al., *Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(11): p. 1865-70.
 21. Escobar-Diaz, E., et al., *AT514, a cyclic depsipeptide from Serratia marcescens, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells: interference with the Akt/NF-kappaB survival pathway*. Leukemia, 2005. **19**(4): p. 572-9.
 22. Rosati, E., et al., *Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells*. Blood, 2009. **113**(4): p. 856-65.
 23. Granziero, L., et al., *Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2777-83.
 24. Jewell, A.P. and K.L. Yong, *Regulation and function of adhesion molecules in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Acta Haematol, 1997. **97**(1-2): p. 67-72.
 25. Kitada, S., et al., *Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 1999. **106**(4): p. 995-1004.
 26. Ticchioni, M., et al., *Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a*. Oncogene, 2007. **26**(50): p. 7081-91.
 27. Lagneaux, L., et al., *Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells*. Leuk Lymphoma, 1999. **35**(5-6): p. 445-53.
 28. Balakrishnan, K., et al., *AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance*. Blood, 2009. **113**(1): p. 149-53.
 29. de la Fuente, M.T., et al., *Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax*. Leukemia, 1999. **13**(2): p. 266-74.

30. de la Fuente, M.T., et al., *Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 495-502.
31. Ghia, P. and F. Caligaris-Cappio, *The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms*. Adv Cancer Res, 2000. **79**: p. 157-73.
32. Smit, L.A., et al., *Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1660-8.
33. Calin, G.A. and C.M. Croce, *Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance*. Semin Oncol, 2006. **33**(2): p. 167-73.
34. Sagatys, E.M. and L. Zhang, *Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Control, 2012. **19**(1): p. 18-25.
35. Krober, A., et al., *Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2006. **24**(6): p. 969-75.
36. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1639-47.
37. Ghia, P., et al., *Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **294**: p. 135-45.
38. Caligaris-Cappio, F., *Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2003. **123**(3): p. 380-8.
39. Burger, J.A., et al., *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies*. Blood, 2009. **114**(16): p. 3367-75.
40. Redondo-Munoz, J., et al., *Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain*. Cancer Cell, 2010. **17**(2): p. 160-72.
41. Riches, J.C., A.G. Ramsay, and J.G. Gribben, *Chronic lymphocytic leukemia: an update on biology and treatment*. Curr Oncol Rep. **13**(5): p. 379-85.
42. Gehrke, I., et al., *Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells*. Mol Med, 2011. **17**(7-8): p. 619-27.
43. Riches, J.C., A.G. Ramsay, and J.G. Gribben, *Chronic lymphocytic leukemia: an update on biology and treatment*. Curr Oncol Rep, 2011. **13**(5): p. 379-85.
44. Robak, T., E. Lech-Maranda, and P. Robak, *Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide or other agents in chronic lymphocytic leukemia*. Expert Rev Anticancer Ther, 2010. **10**(10): p. 1529-43.

-
45. Robak, T., et al., *Comparison of cladribine plus cyclophosphamide with fludarabine plus cyclophosphamide as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia: a phase III randomized study by the Polish Adult Leukemia Group (PALG-CLL3 Study)*. J Clin Oncol, 2010. **28**(11): p. 1863-9.
 46. Wierda, W.G., et al., *Chemoimmunotherapy with O-FC in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **117**(24): p. 6450-8.
 47. Lozanski, G., et al., *Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3278-81.
 48. Chanan-Khan, A. and C.W. Porter, *Immunomodulating drugs for chronic lymphocytic leukaemia*. Lancet Oncol, 2006. **7**(6): p. 480-8.
 49. Konopleva, M., et al., *Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax)*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3413-20.
 50. Byrd, J.C., et al., *Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2007. **109**(2): p. 399-404.
 51. Lee, Y.K., et al., *VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2004. **104**(3): p. 788-94.
 52. Paesler, J., et al., *The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vatalanib and pazopanib potently induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo*. Clin Cancer Res. **16**(13): p. 3390-8.
 53. Awan, F.T., et al., *Thalidomide and lenalidomide as new therapeutics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma. **51**(1): p. 27-38.
 54. Michie, A.M., R. Nakagawa, and A.M. McCaig, *Murine models for chronic lymphocytic leukaemia*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1009-12.
 55. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): p. 1910-6.
 56. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
 57. Raveche, E.S., et al., *Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5079-86.
 58. Klein, U., et al., *The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 28-40.
 59. Shimoni, A., et al., *Refractory pure red cell aplasia associated with B-CLL: successful treatment with a combination of fludarabine, cyclosporin A and erythropoietin*. Leukemia, 1999. **13**(1): p. 142-3.

60. Marcus, H., et al., *Human/mouse radiation chimera generated from PBMC of B chronic lymphocytic leukemia patients with autoimmune hemolytic anemia produce anti-human red cell antibodies*. Leukemia, 1997. **11**(5): p. 687-93.
61. Peterson, L. and A.R. Kini, *Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2529.
62. Kay, N.E., et al., *B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules*. Leukemia, 2002. **16**(5): p. 911-9.
63. Ding, W., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch*. Blood. **116**(16): p. 2984-93.
64. Maffei, R., et al., *Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia*. Blood. **116**(4): p. 584-92.
65. Otrock, Z.K., J.A. Makarem, and A.I. Shamseddine, *Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **38**(3): p. 258-68.
66. Wang, L., et al., *VEGF-induced survival of chronic lymphocytic leukemia is independent of Bcl-2 phosphorylation*. Leukemia, 2005. **19**(8): p. 1486-7.
67. Bairey, O., et al., *Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **113**(2): p. 400-6.
68. Farahani, M., et al., *Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells*. Leukemia, 2005. **19**(4): p. 524-30.
69. McEver, R.P., *Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 581-6.
70. Vincent, A.M., J.C. Cawley, and J. Burthem, *Integrin function in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1996. **87**(11): p. 4780-8.
71. Rossi, D., et al., *CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2008. **93**(10): p. 1575-9.
72. Gattei, V., et al., *Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2008. **111**(2): p. 865-73.
73. Lopez-Giral, S., et al., *Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 462-71.
74. Alfonso-Perez, M., et al., *Anti-CCR7 monoclonal antibodies as a novel tool for the treatment of chronic lymphocyte leukemia*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1157-65.

-
75. Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps, *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3658-67.
 76. Mohle, R., et al., *Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)*. Leukemia, 1999. **13**(12): p. 1954-9.
 77. Barretina, J., et al., *CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease*. Ann Hematol, 2003. **82**(8): p. 500-5.
 78. Till, K.J., et al., *CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4813-9.
 79. Richardson, S.J., et al., *ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3584-92.
 80. Ticchioni, M., et al., *Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3111-8.
 81. Hartmann, T.N., et al., *Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3121-30.
 82. Hynes, R.O., *Integrins: a family of cell surface receptors*. Cell, 1987. **48**(4): p. 549-54.
 83. Pribila, J.T., et al., *Integrins and T cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 157-80.
 84. Hughes, P.E. and M. Pfaff, *Integrin affinity modulation*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(9): p. 359-64.
 85. Carman, C.V. and T.A. Springer, *Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 547-56.
 86. Liddington, R.C. and M.H. Ginsberg, *Integrin activation takes shape*. J Cell Biol, 2002. **158**(5): p. 833-9.
 87. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
 88. Lobb, R.R. and M.E. Hemler, *The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 1722-8.
 89. Rose, D.M., J. Han, and M.H. Ginsberg, *Alpha4 integrins and the immune response*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 118-24.
 90. Bednarczyk, J.L. and B.W. McIntyre, *Expression and ligand-binding function of the integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4) on neural-crest-derived tumor cell lines*. Clin Exp Metastasis, 1992. **10**(4): p. 281-90.

91. Teixido, J., et al., *Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage*. J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1786-91.
92. Verfaillie, C.M., J.B. McCarthy, and P.B. McGlave, *Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV*. J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1232-41.
93. Uchiyama, H., et al., *Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines*. Blood, 1992. **80**(9): p. 2306-14.
94. Uchiyama, H., et al., *Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion*. Blood, 1993. **82**(12): p. 3712-20.
95. Zarcone, D., et al., *Functional and clinical relevance of CD44 variant isoform expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Haematologica, 1998. **83**(12): p. 1088-98.
96. Eisterer, W., et al., *Elevated levels of soluble CD44 are associated with advanced disease and in vitro proliferation of neoplastic lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Leuk Res, 2004. **28**(10): p. 1043-51.
97. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 33-45.
98. Lesley, J. and R. Hyman, *CD44 structure and function*. Front Biosci, 1998. **3**: p. d616-30.
99. Marhaba, R. and M. Zoller, *CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation*. J Mol Histol, 2004. **35**(3): p. 211-31.
100. Naor, D., R.V. Sionov, and D. Ish-Shalom, *CD44: structure, function, and association with the malignant process*. Adv Cancer Res, 1997. **71**: p. 241-319.
101. Cichy, J. and E. Pure, *The liberation of CD44*. J Cell Biol, 2003. **161**(5): p. 839-43.
102. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 35-48.
103. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
104. Lopez-Otin, C. and L.M. Matrisian, *Emerging roles of proteases in tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 800-8.
105. McCawley, L.J. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression*. Mol Med Today, 2000. **6**(4): p. 149-56.
106. Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 221-33.

-
107. Cauwe, B., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007. **42**(3): p. 113-85.
 108. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
 109. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
 110. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
 111. Overall, C.M., *Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies*. Methods Mol Biol, 2001. **151**: p. 79-120.
 112. Bode, W., et al., *The metzincin-superfamily of zinc-peptidases*. Adv Exp Med Biol, 1996. **389**: p. 1-11.
 113. Piccard, H., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(4): p. 870-92.
 114. Van den Steen, P.E., et al., *The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18626-37.
 115. Sanchez-Lopez, R., et al., *Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7238-47.
 116. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
 117. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-44.
 118. Luca, M., et al., *Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 1105-13.
 119. Mira, E., et al., *Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 9): p. 1847-57.
 120. Imai, K., et al., *Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release*. Biochem J, 1997. **322** (Pt 3): p. 809-14.
 121. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 448-64.

122. Bjorklund, M. and E. Koivunen, *Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1755**(1): p. 37-69.
123. Opdenakker, G., P.E. Van den Steen, and J. Van Damme, *Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 571-9.
124. Rosenblum, G., et al., *Insights into the structure and domain flexibility of full-length pro-matrix metalloproteinase-9/gelatinase B*. Structure, 2007. **15**(10): p. 1227-36.
125. Van den Steen, P.E., et al., *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**(6): p. 375-536.
126. Van den Steen, P.E., et al., *Generation of glycosylated remnant epitopes from human collagen type II by gelatinase B*. Biochemistry, 2004. **43**(33): p. 10809-16.
127. Rudd, P.M., et al., *Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin*. Biochemistry, 1999. **38**(42): p. 13937-50.
128. Mattu, T.S., et al., *O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme*. Biochemistry, 2000. **39**(51): p. 15695-704.
129. Khan, M.M., et al., *Protein disulfide isomerase-mediated disulfide bonds regulate the gelatinolytic activity and secretion of matrix metalloproteinase-9*. Exp Cell Res, 2012. **318**(8): p. 904-14.
130. Cha, H., et al., *Structural basis of the adaptive molecular recognition by MMP9*. J Mol Biol, 2002. **320**(5): p. 1065-79.
131. Triebel, S., et al., *A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase*. FEBS Lett, 1992. **314**(3): p. 386-8.
132. Olson, M.W., et al., *Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2661-8.
133. Okada, Y., et al., *Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21712-9.
134. O'Connell, J.P., et al., *Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 14967-73.
135. Opdenakker, G., et al., *Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 851-9.
136. Vandooren, J., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. **48**(3): p. 222-72.

-
137. Clark, I.M., et al., *The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1362-78.
 138. Opdenakker, G., *New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock*. Verh K Acad Geneesk Belg, 2001. **63**(6): p. 531-8; discussion 538-41.
 139. Steenport, M., et al., *Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 8119-27.
 140. Wong, H.P., et al., *Effects of adrenaline in human colon adenocarcinoma HT-29 cells*. Life Sci, 2011. **88**(25-26): p. 1108-12.
 141. Wu, X. and G. Brewer, *The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0*. Gene, 2012. **500**(1): p. 10-21.
 142. Hieronymus, H. and P.A. Silver, *A systems view of mRNP biology*. Genes Dev, 2004. **18**(23): p. 2845-60.
 143. Fahling, M., et al., *Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1731**(1): p. 32-40.
 144. Zitka, O., et al., *Matrix metalloproteinases*. Curr Med Chem, 2010. **17**(31): p. 3751-68.
 145. Goldberg, G.I., et al., *Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4583-91.
 146. Hu, J., et al., *Simulation of evolution-selected propeptide by high-throughput selection of a peptidomimetic inhibitor on a capillary DNA sequencer platform*. Anal Chem, 2005. **77**(7): p. 2116-24.
 147. Paemen, L., et al., *The gelatinase inhibitory activity of tetracyclines and chemically modified tetracycline analogues as measured by a novel microtiter assay for inhibitors*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(1): p. 105-11.
 148. Acuff, H.B., et al., *Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 259-66.
 149. Kunigal, S., et al., *Matrix metalloproteinase-9 inhibition down-regulates radiation-induced nuclear factor-kappa B activity leading to apoptosis in breast tumors*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3617-26.
 150. Meyer, E., et al., *Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C-potentiated, p53-mediated apoptosis*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4261-72.
 151. Ringshausen, I., et al., *Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells*. Leukemia, 2004. **18**(12): p. 1964-70.

152. Monferran, S., et al., *The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9*. *Embo J*, 2004. **23**(19): p. 3758-68.
153. Olson, M.W., et al., *High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(17): p. 10672-81.
154. Stefanidakis, M., et al., *Intracellular and cell surface localization of a complex between alphaMbeta2 integrin and promatrix metalloproteinase-9 progelatinase in neutrophils*. *J Immunol*, 2004. **172**(11): p. 7060-8.
155. Stefanidakis, M. and E. Koivunen, *Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1441-50.
156. Chou, C.S., et al., *Regulatory effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II on the levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in primary cultures of human extravillous cytotrophoblasts*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(10): p. 4781-90.
157. Li, W. and J.R. Challis, *Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(12): p. 6569-74.
158. Hu, J., et al., *Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(6): p. 480-98.
159. Ardi, V.C., et al., *Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(38): p. 25854-66.
160. Vu, T.H., et al., *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 411-22.
161. Nyman, J.S., et al., *Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone*. *J Bone Miner Res*, 2011. **26**(6): p. 1252-60.
162. Redondo-Munoz, J., et al., *Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the phosphoinositide 3-kinase/Akt survival pathway via c-jun-NH2 terminal kinase activation and PTEN upregulation*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(17): p. 4382-91.
163. Roeb, E., et al., *The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(52): p. 50326-32.
164. Burg-Roderfeld, M., et al., *MMP-9-hemopexin domain hampers adhesion and migration of colorectal cancer cells*. *Int J Oncol*, 2007. **30**(4): p. 985-92.
165. Hahn-Dantona, E., et al., *The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 15498-503.

-
166. Geurts, N., et al., *Beta-hematin interaction with the hemopexin domain of gelatinase B/MMP-9 provokes autocatalytic processing of the propeptide, thereby priming activation by MMP-3*. *Biochemistry*, 2008. **47**(8): p. 2689-99.
 167. Dufour, A., et al., *Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration*. *J Cell Physiol*, 2008. **217**(3): p. 643-51.
 168. Mantuano, E., et al., *The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein*. *J Neurosci*, 2008. **28**(45): p. 11571-82.
 169. Ezhilarasan, R., et al., *The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(2): p. 306-15.
 170. Dufour, A., et al., *Small-molecule anticancer compounds selectively target the hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9*. *Cancer Res*, 2011. **71**(14): p. 4977-88.
 171. Bauvois, B., et al., *Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: suppression by interferons*. *Leukemia*, 2002. **16**(5): p. 791-8.
 172. Redondo-Munoz, J., et al., *MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration*. *Blood*, 2006. **108**(9): p. 3143-51.
 173. Kamiguti, A.S., et al., *The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2004. **125**(2): p. 128-40.
 174. Redondo-Munoz, J., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration*. *Blood*, 2008. **111**(1): p. 383-6.
 175. Mould, A.P., et al., *Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIICS region of fibronectin*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(44): p. 27224-30.
 176. Munoz, M., et al., *A region of the integrin VLA alpha 4 subunit involved in homotypic cell aggregation and in fibronectin but not vascular cell adhesion molecule-1 binding*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(5): p. 2696-702.
 177. Redondo-Munoz, J., et al., *Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells*. *Blood*, 2008. **112**(1): p. 169-78.
 178. Arnaout, M.A., S.L. Goodman, and J.P. Xiong, *Coming to grips with integrin binding to ligands*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(5): p. 641-51.
 179. Dias, S., et al., *Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(4): p. 511-21.

180. Belotti, D., et al., *Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5224-9.
181. Hollborn, M., et al., *Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(9): p. 4360-7.
182. Gupta, A., C.Q. Zhou, and M.A. Chellaiah, *Osteopontin and MMP9: Associations with VEGF Expression/Secretion and Angiogenesis in PC3 Prostate Cancer Cells*. Cancers (Basel), 2013. **5**(2): p. 617-38.
183. Monferran, S., et al., *The Membrane-associated form of the DNA repair protein Ku is involved in cell adhesion to fibronectin*. J Mol Biol, 2004. **337**(3): p. 503-11.
184. Bailon, E., et al., *Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen*. J Leukoc Biol, 2014.
185. Bauvois, B., *New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1825**(1): p. 29-36.
186. Murphy, G. and H. Nagase, *Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment*. FEBS J, 2011. **278**(1): p. 2-15.
187. Bourguignon, L.Y., D. Zhu, and H. Zhu, *CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression*. Front Biosci, 1998. **3**: p. d637-49.
188. Bourguignon, L.Y., et al., *CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells*. J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 206-15.
189. Brooks, P.C., et al., *Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity*. Cell, 1998. **92**(3): p. 391-400.
190. Monaco, S., et al., *Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains*. Protein Sci, 2006. **15**(12): p. 2805-15.
191. Humphries, M.J., et al., *Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion*. J Biol Chem, 1987. **262**(14): p. 6886-92.
192. Garcia-Pardo, A., et al., *Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin. The interaction of the alpha 4 beta 1 integrin with the LHGPEILDVPST sequence of the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment*. J Immunol, 1990. **144**(9): p. 3361-6.
193. Ugarte-Berzal, E., et al., *A 17-residue sequence from the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain binds alpha4beta1 integrin and inhibits MMP-9-induced functions in chronic lymphocytic leukemia B cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(33): p. 27601-13.

-
194. Ramani, V.C., G.P. Kaushal, and R.S. Haun, *Proteolytic action of kallikrein-related peptidase 7 produces unique active matrix metalloproteinase-9 lacking the C-terminal hemopexin domains*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(8): p. 1525-31.
 195. Ugarte-Berzal, E., et al., *A Novel CD44-binding Peptide from the pro-Matrix Metalloproteinase-9 Hemopexin Domain Impairs Adhesion and Migration of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells*. *J Biol Chem*, 2014.
 196. Stefanidakis, M., et al., *Identification of a negatively charged peptide motif within the catalytic domain of progelatinases that mediates binding to leukocyte beta 2 integrins*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 34674-84.
 197. Stefanidakis, M., et al., *Role of leukemia cell invadosome in extramedullary infiltration*. *Blood*, 2009. **114**(14): p. 3008-17.
 198. Bjorklund, M., P. Heikkila, and E. Koivunen, *Peptide inhibition of catalytic and noncatalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 29589-97.
 199. Wayner, E.A. and N.L. Kovach, *Activation-dependent recognition by hematopoietic cells of the LDV sequence in the V region of fibronectin*. *J Cell Biol*, 1992. **116**(2): p. 489-97.
 200. Moyano, J.V., et al., *Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated alpha4beta1 and alpha4beta7 integrins*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(40): p. 24832-6.
 201. Remacle, A.G., et al., *Novel MT1-MMP small-molecule inhibitors based on insights into hemopexin domain function in tumor growth*. *Cancer Res*, 2012. **72**(9): p. 2339-49.
 202. Pleyer, L., et al., *Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. **6**(7): p. 405-18.
 203. Qin, G., et al., *[Expression and significance of CD44v6 and MMP-9 in laryngeal squamous cell carcinoma]*. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2005. **19**(15): p. 688-91.
 204. Till, K.J., M. Zuzel, and J.C. Cawley, *The role of hyaluronan and interleukin 8 in the migration of chronic lymphocytic leukemia cells within lymphoreticular tissues*. *Cancer Res*, 1999. **59**(17): p. 4419-26.
 205. Girbl, T., et al., *CD40-mediated activation of chronic lymphocytic leukemia cells promotes their CD44-dependent adhesion to hyaluronan and restricts CCL21-induced motility*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 561-70.
 206. Zhang, S., et al., *Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(15): p. 6127-32.
 207. Ugarte-Berzal, E., et al., *VEGF/VEGFR2 interaction down-regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration*. *Blood*, 2010. **115**(4): p. 846-9.
 208. Bartoli, M., et al., *Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(43): p. 33189-92.

209. Ma, Z., H. Qin, and E.N. Benveniste, *Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5150-9.
210. Nguyen, J., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by interferons and TGF-beta1 through distinct signalings accounts for reduced monocyte invasiveness*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5487-93.
211. Ma, Z., et al., *Interferon-gamma-activated STAT-1alpha suppresses MMP-9 gene transcription by sequestration of the coactivators CBP/p300*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 515-23.
212. Aguayo, A., et al., *Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2000. **96**(2): p. 768-70.
213. Kini, A.R., N.E. Kay, and L.C. Peterson, *Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2000. **14**(8): p. 1414-8.
214. Dixelius, J., et al., *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40973-9.
215. Zeng, H., et al., *Heterotrimeric G alpha q/G alpha 11 proteins function upstream of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR) phosphorylation in vascular permeability factor/VEGF signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20738-45.
216. Buggins, A.G., et al., *Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9*. Br J Haematol, 2011. **154**(2): p. 216-22.
217. Bello, L., et al., *Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2*. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8730-6.

Anexos

Publicaciones del autor relacionadas con el trabajo de tesis

1. Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., García-Marco, J.A., Hernández del Cerro, M., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Terol, M.J., and García-Pardo, A. 2008. $\alpha 4\beta 1$ integrin and 190 kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase-B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood*, 112: 169-178.

Comentario editorial: Nowakowski, G.S. 2008. Gang of 3 in aggressive CLL? *Blood*, 112: 5-6.

2. **Ugarte-Berzal, E., Redondo-Muñoz, J., Eroles, P., Hernández del Cerro, M., García-Marco, J.A., Terol, M.J., and García-Pardo, A. 2010. VEGF/VEGFR2 interaction downregulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood*, 115: 846-849. (Anexo I)**
3. Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M.J., Van den Steen, P.E., Hernández del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opdenakker, G., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. 2010. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promotes chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell*, 17: 160-172.
4. **Ugarte-Berzal, E., Bailón, E., Amigo-Jiménez, I., Vituri, C.L., Hernández del Cerro, M., Terol, M.J., Albar, J.P., Rivas, G., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. 2012. A 17-residue sequence from the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain binds $\alpha 4\beta 1$ integrin and inhibits MMP-9-induced functions in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Biol. Chem.* 287: 27601-27613. (Anexo II)**
5. Bailón, E., Ugarte-Berzal, E., Amigo-Jiménez, I., Terol, M.J., Van den Steen, P., Opdenakker, G., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. 2014. Overexpression of pro-gelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen *J. Leuk. Biol. En prensa*.
6. **Ugarte-Berzal, E., Bailón, E., Amigo-Jiménez, I., Albar, J.P., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. 2014. A novel CD44-binding peptide from the proMMP-9 hemopexin domain impairs adhesion and migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem. En prensa* (Anexo III)**
7. Amigo-Jiménez, I., Bailón, E., Ugarte-Berzal, E., Aguilera-Montilla, N., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. 2014. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *Enviado*.

Anexo I